

修飾シクロデキストリンの合成とその酵素型反応への応用

著者	飯島 政雄
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/55184

博士學位論文

論文題目 修飾シクロデキストリンの
合成とその酵素型反応への応用

提出者 東北大学大学院工学研究科

生物工学 専攻

学籍番号 8D108

氏名 飯島政雄

指 導 教 官	加 藤 紀 元 教 授
審 査 委 員 (○印は主査)	○ 加 藤 教 授 1 宮 野 教 授 2 西 野 教 授 3 教 授 4 教 授

備考(1) 外国人留学生は、国籍を記入すること。
(2) 履歴事項は、大学入学から年次にしたがって記入すること。
(3) 博士課程の修了年月日は、学位記授与式年月日を記入すること。

①

修飾シクロデキストリンの合成と
その酵素型反応への応用

1999 年 1 月 20 日

東北大学大学院工学研究科 生物工学専攻

飯 島 政 雄

目 次

第1章	序 論	1
1-1	天然酵素とそのモデル化	1
1-2	シクロデキストリンを用いた人工酵素	7
1-3	参考文献	13
第2章	エステル加水分解におけるイミダゾールの一般塩基および酸触媒作用	16
2-1	実 験	17
2-2	結 果	19
2-3	考 察	24
2-3-1	一般塩基触媒作用	24
2-3-2	一般酸触媒作用	28
2-4	参考文献	31
第3章	イオン性シクロデキストリンの包接挙動	33
3-1	実 験	35
3-2	結 果	38
3-3	考 察	41
3-4	参考文献	44
第4章	シクロデキストリンに包接された基質の加水分解	45
4-1	実 験	47
4-2	結 果	48
4-3	考 察	53
4-4	参考文献	59

第5章	修飾シクロデキストリンによる酵素型反応	60
5-1	実 験	63
5-2	結 果	67
5-3	考 察	74
5-3-1	ヒスタミン修飾シクロデキストリンの触媒活性	74
5-3-2	グリシン修飾シクロデキストリンの触媒活性	78
5-4	参考文献	81
第6章	グリシン修飾シクロデキストリン-金属錯体の反応挙動	82
6-1	実 験	85
6-2	結 果	87
6-3	考 察	98
6-3-1	グリシン修飾シクロデキストリンと銅イオンとの錯体形成	98
6-3-2	<i>m</i> -および <i>p</i> -置換フェニルエステルの加水分解	99
6-3-3	Boc アミノ酸フェニルエステルの加水分解	106
6-3-4	長鎖カルボン酸 <i>p</i> -ニトロフェニルエステルの加水分解	107
6-4	参考文献	112
第7章	結 論	114
	謝 辞	117

第1章 序 論

1-1 天然酵素とそのモデル化

酵素は生体内にある触媒であり、生命維持のために必要な全ての反応に関与しており、そしてそれは独自の構造と機能を持ち、長い進化の歴史によってより高度に洗練されたタンパク質である。酵素の優れた特性として次のことが挙げられる。¹ すなわち、中性、常温、常圧下での(1) 反応加速性、(2) 基質特異性、(3) 反応選択性、(4) 位置特異性、そして(5) 立体特異性である。

例えば、酵素による反応加速性は 10^{10} 倍にもなり、酵素なしにはほとんど反応は起こらないことを意味している。また、基質との結合においてもその結合定数は $10^3 \sim 10^7$ と強いものである。これらの特性は、すでに 100 年以上も前に Fischer が表した「鍵」と「鍵穴」で簡単に説明される。つまり、「鍵」となる基質が、「鍵穴」である酵素分子中の窪みや裂け目になっている結合部位にぴったりと入り、活性中心にある特定のアミノ酸残基が基質反応点に近接し、高い反応加速性や基質特異性が達成されている。

19 世紀になってから、Haber-Bosch 法のアンモニア合成における鉄触媒や高分子合成における Ziegler-Natta 触媒、近年ではオレフィンの選択的水素化における Wilkinson 錯体触媒など、化学合成による新しい触媒の開発によって、重要な多くの反応が工業的に可能となった。これら化学合成による触媒の反応加速性や基質選択性は酵素に及ぶものではないが、最近、実験室レベルでは酵素に迫る能力の化学触媒が合成されつつある。

それでも天然酵素の優位性が変わらないのは酵素反応が常温、常圧下、中性 pH の水媒体中という温和な条件のもとで、しかも微量で効力を発揮しているということによる。すでに、酵素はこのような特性から味噌や醤油をはじめとした醗酵、食品工業で、また現在では有機合成や臨床分析用の試薬としても使用されている。しかしながら酵素の単離精製は容易ではなく、その結果として酵素は高価なものになっている。さらに、酵素はタンパク質であるために、その活性は温度や pH による影響を受けやすいという欠点を持っている。

一方、生体内で起こっている化学反応を物理有機化学的手段によって解析しようとする試みが、1950 年代から生化学者と化学者の双方によってなされるようになった。これはこの時代、X 線回折装置の発達によって酵素や DNA など多くの生体物質の構造が解明されたためでもある。このような研究の初期には、酵素と基質の非共有結合によってもたらされる反応点の近接効果が、溶液内反応では分子間から分子内反応へ同種の反応を置き換えたときのエントロピー効果によって説明された。そして、活性部位のアミノ酸残基による触媒反応は、溶液内でのプロトン移動を伴う一般酸-塩基触媒反応を用いて研究された。また、酵素の強い基質結合からは酵素の大きな反応加速性を説明することはできなかった。それは、安定な酵素-基質複合体が反応するためには大きな ΔG^\ddagger を必要とするからである。しかしその後の多くの研究から、活性部位は遷移状態に適合するような構造をしており、基質との結合にはひずみがあって酵素-基質複合体は不安定なものであることがわかってきた。加えて、酵素と基質との結合に

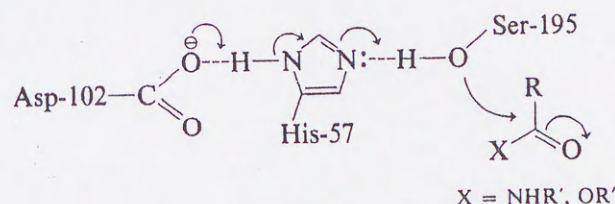
よって活性部位の構造が変化し、触媒官能基が適切に反応点に配向するなど、多くの要因が遷移状態を安定化 (ΔG^\ddagger を減少) させていることが考えられている。²

酵素の X 線回折は特に入手しやすい加水分解酵素について盛んに行われ、三次元構造とともにその作用機構が次第に明らかになった。Figure 1 には、すい臓から分泌されタンパク質を加水分解するセリン酵素のひとつで、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル側を切断する α -キモトリプシンの三次元構造を示した。



Figure 1. Three-dimensional structure of α -chymotrypsin. Only the α -carbon atoms are shown.

X線結晶構造解析からその活性部位には Ser-195 の他に His-57 や Asp-102 が位置していることがわかった。³ α -キモトリプシンによるアミド基質の加水分解反応では、Ser 水酸基が疎水性ポケットに結合した基質のカルボニル炭素を攻撃してアシル化酵素中間体を生成し、さらに His イミダゾール基の一般塩基触媒作用によってこれが加水分解されると考えられている。以前は、Ser 水酸基の基質への攻撃が、次のような“電荷リレー系”によって活性化されていると説明されていたが、現在では、 α -キモトリプシンの反応促進作用の大部分は反応遷移状態の優先的な結合によるものであり、“電荷リレー系”による促進作用は少ないことが調べられている。⁴



上記のような研究から、複雑な酵素反応も効率の良い単純な化学反応の組み合わせや遷移状態の安定化から成り立っているものであり、生体内の反応を化学的に解明できるようになってきた。このことは逆に考えると、このような単純な化学反応を基にして、有機小分子から生体類似機能を持つ物質を化学的に再構築することができることを意味している。こうした溶液内の反応によって、酵素類似あるいは酵素にはない新しい機能を持った人工酵素（酵素モデル）を創り、これを用いて酵素型の反応に応用することは、反応の効率化、省資源、省エネルギー、環境の浄化という観点から重要な意義を持っている。

人工酵素を用いた酵素型反応の研究には次のような手法がある。⁵

- (a) 化学的またはタンパク質工学による天然酵素の修飾、改良
- (b) 分子内反応など反応機構をもとにした小分子による反応の模倣
- (c) 基質との結合過程をホスト-ゲスト分子間の分子認識作用とした再現
- (d) 結合部位とそれに近接した触媒官能基を併せ持つモデル物質の設計

(a)では高機能性のものが得られる反面、タンパク質であることの欠点を持つことになる。(b)は酵素反応機構の解析が中心になる。(c)は強力で特異的な結合作用を持つホスト分子（人工レセプター）として、“超分子”や“分子集合体”に進展している。⁶ 遷移状態との安定な結合ができるように設計した触媒抗体⁷もまた、結合過程に基づいたものである。(d)では多くの種類のモデル物質の設計⁸が可能であり、その設計に当たっては、さらに次の事を考慮する必要がある。

- (i) 基質との結合は疎水性結合のような非共有結合であること
- (ii) さらに静電的結合や水素結合など他の相互作用で結合が促進できること
- (iii) 結合した基質に作用できる触媒官能基を持つこと
- (iv) 複合体における基質の配向や立体化学が明確であること
- (v) 水溶性で生理条件下、触媒活性を持つこと

基質との結合場を与えるものとして、シクロデキストリンや大環状化合物（クラウンエーテル、カリックスアレーン、クリプタンド）、ミセル、ポリマーなどがあり、すでに多くの酵素モデル系が構築されている。⁹ これらの内で、シクロデキストリンは構造の明らかな数種類のものが市販されており、入手が容

易であり、さらに、シクロデキストリンについては次節の 1-2 で述べるごとく多くの物理的・化学的な基礎データが蓄積されている。¹⁰

本研究ではシクロデキストリンを結合部位とし、これに触媒官能基を修飾して酵素型反応を行うことにした。特にここでは、セリン酵素類のモデル系としてシクロデキストリンにイミダゾール基を導入し、中性 pH でも活性で、しかもターンオーバー（繰り返し反応）可能な酵素型反応を達成しようとした。また、シクロデキストリンの Gly 修飾体は、Glu や Asp のカルボキシル基が酸触媒として作用する酵素であるリゾチームのモデルとして、取り込んだ基質の分解を促進できるかどうかを検討した。さらに、酵素反応の加速性や基質特異性は遷移状態の安定化にあることから、結合部位となるシクロデキストリン環を 2 個持つ Gly 修飾シクロデキストリンの金属錯体を用いて、基質構造や遷移状態構造に適合するより高度な酵素モデル系の構築を試みた。

シクロデキストリンはシクロアミロースとも言い、デンプンを含む培地から *Bacillus amylobacter* のシクロデキストリン合成酵素、cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) によってできることが 1894 年に Villiers により発見された。¹¹ そして 1900 年代に入り、それがグルコースの環状オリゴマーであることを Schardinger が報告し、¹² その生産菌も単離され、*Bacillus macerans* と命名された。その結果、シクロデキストリンは Schardinger dextrin と呼ばれてきた。1938 年には Freudenberg らによってその詳細な構造が明らかになり、¹³ その後、French や Cramer らによっていろいろな化合物との複合体形成が系統的に調べられた。¹⁴ 1970 年代に入ってシクロデキストリンを生産するたくさんの種類の菌が発見され、その工業的スケールでの生産が可能になった。現在、シクロデキストリンは日本をはじめ数カ国で大量生産されており、食品、医薬、トイレタリー、分析化学等の広い分野で利用されている。¹⁵

このピラノース環はいす型構造であり、CD は全体として“ドーナツ状”あるいは“底の無いバケツ”のような円筒になっており、口径の狭い方の縁にはグルコース炭素 C-6 位の一級水酸基が、口径の広い方の縁には C-2、C-3 位の二級水酸基が位置している (Figure 2)。これらの二級水酸基は隣のグルコース単位間で水素結合し、CD の円筒構造を安定化させている。また、CD は数個から 10 数個の水分子と水和物を形成することもでき、それによってその構造はゆがんだものになることが確かめられている。¹⁶ CD の大きさは Table1 に示した通りで、その空洞内は疎水的雰囲気であり、 α -CD ではベンゼン環がちょうど適合する大きさである。

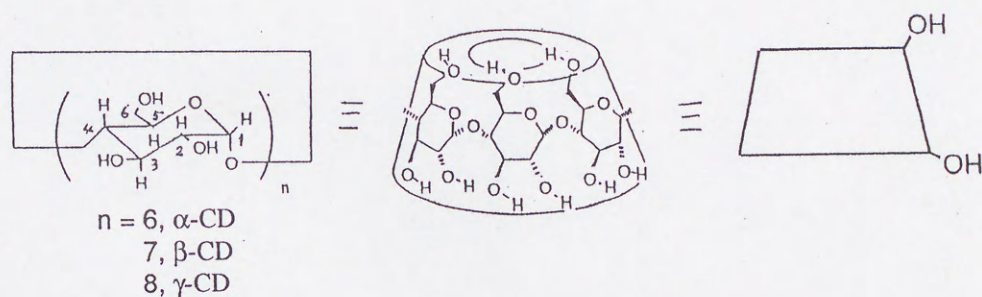


Figure 2. Structure of cyclodextrins.

Table 1 Some physical properties of the cyclodextrins

Cyclodextrin	No. of glucose unit	Mol. wt.	Water solubility ^{a)}	Cavity ^{b)} diameter/Å	External diameter/Å
α	6	972	14.5	4.7 - 5.2	14.6
β	7	1,135	1.85	6.0 - 6.4	15.4
γ	8	1,297	23.2	7.5 - 8.3	17.5

^{a)} g/100 ml water at room temperature. ^{b)} Height of the CD ring: 7.9–8 Å.

CD の複合体形成能力は、修飾 CD による酵素型反応構築の重要な要素である。CD は有機、無機化合物を問わず、中性分子からイオン性分子まで多種多様の物質をゲスト分子として結合できる。しかし、その大きさや形によって結合力が変化することから、結合は主に CD 空洞内へのゲスト分子の取り込み（包接）によって行われており、多くの CD 複合体の結晶構造が X 線結晶構造解析によって明らかにされている。¹⁷ CD は一般にゲスト分子に対して 1:1 複合体を形成するが、大きなものや長いゲスト分子に対しては 2:1 や 1:2 などの結合比の複合体も存在する。¹⁸ また、CD には多くの不斉炭素があるため、CD 空洞内部は不斉の場としても作用し、立体異性を有するゲスト分子との複合体形成では立体選択性を示すことも確認されている。¹⁹

これらの複合体形成は、ゲスト分子の UV や蛍光、円偏光二色性、NMR などのスペクトル変化や溶解度、pKa の変化からも観察することができる。²⁰ このときの結合の駆動力は、極性分子も CD に包接されることから疎水性の相互作用によるものだけではない。それは次のような他のいくつかの非共有結合的な作用が相互に関連し、組み合わされたものであると考えられている。²¹

- (1) CD 空洞からの“高エネルギーの水分子”の放出
- (2) CD 環自体の持っているひずみエネルギーの解除
- (3) 疎水性相互作用
- (4) 静電的（双極子—双極子）相互作用
- (5) 水素結合

(6) 双極子—誘起双極子相互作用

(7) ロンドン分散力

最後の(6)と(7)は van der Waals 力とも表現されるが、結合力に対するこれらの相対的な寄与の程度は、ゲスト分子の種類や溶媒によっても異なり明らかになっていない。

CD 上の水酸基による触媒作用は、1953 年 Cramer らによってマンデル酸エステルの加水分解において最初に観察された。²² このときの CD による加速効果は 1.4 倍しかなかったが、反応に不斉選択性があることが見出された。一方、Bender らが *m*- および *p*-置換フェニルエステルの加水分解で CD の触媒作用を詳細に検討した。²³ この反応は Michaelis-Menten 型の速度式に従い、Figure 3 のように進行すると説明された。つまり、はじめに基質エステルがそのカルボニル基を CD 二級水酸基側にして非共有結合的に包接され、続いてこの水酸基がエステルカルボニル炭素を求核攻撃し、フェノールとアシル化 CD 中間体を生成する。次に、このアシル化体が加水分解され、カルボン酸と元の CD を与えるというものである。ここで、CD とエステルとの結合力は *m*-置換体と *p*-置換体ではほぼ同じであったが、複合体形成後の分解速度定数は *m*-体についての方が *p*-体よりもはるかに大きく、CD は置換フェニルエステルの加水分解において *m*-体選択性を持つことが観察された。これは、基質エステルがニトロ基を一級水酸基側にして CD 環内に入り、反応する CD の二級水酸基と基質カルボニル炭素との位置が *m*-置換体では *p*-体より近くなるためと説明された。そして、このときの反応速度は置換基の電子的効果に依存せず、複合体中の反応点の近接（配向）が

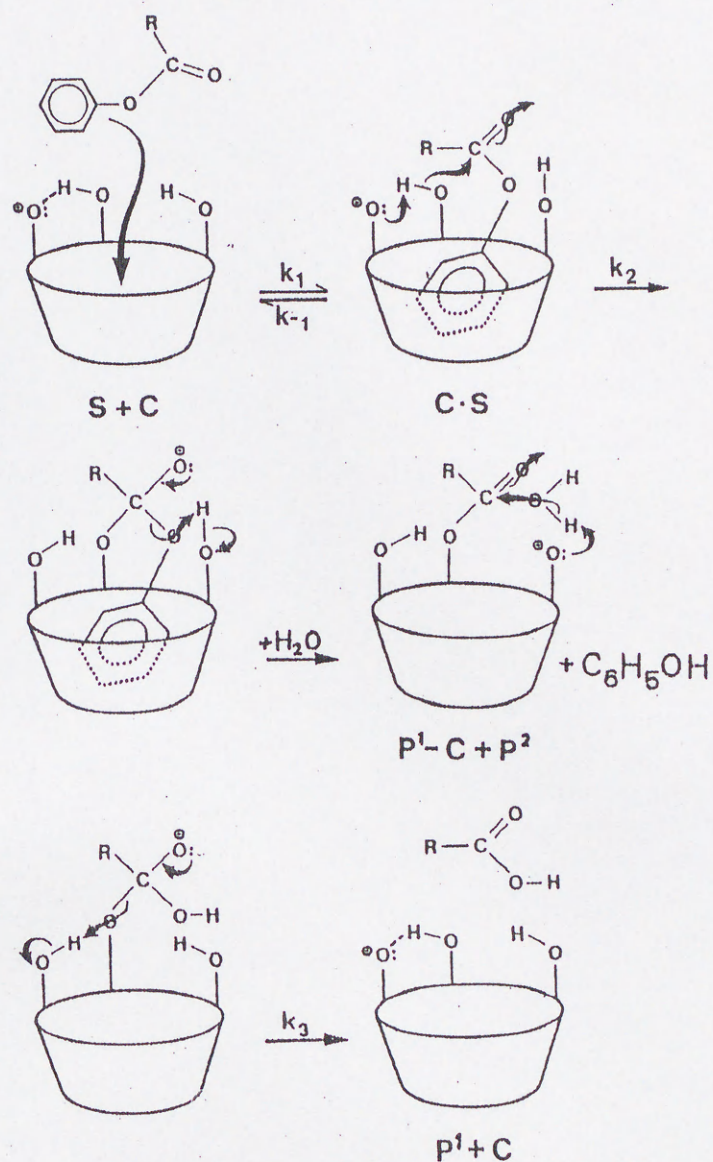


Figure 3. Schematic representation of the hydrolysis of phenyl acetate (S) to acetic acid (P¹) and phenol (P²) as catalyzed by cyclodextrin (C).

反応加速に重要であることが示唆された。しかしながら、ここで生成したアシル化 CD 中間体の分解速度がその生成速度にくらべて大変遅いため、CD は繰り返し反応 (turn-over) できない酵素モデルであった。また、触媒官能基がアルコール性水酸基であることから、中性 pH 領域での触媒活性は低いものであった。

α キモトリプシンのモデルとして、これらの欠点を改良するために CD にイミダゾールを修飾したものも合成されたが、その構造や反応機構はあいまいで、触媒活性も低かった。²⁴ その後、種々のエステルやアミド基質の加水分解に対して CD の触媒作用が試され、脱炭酸反応や付加反応、酸化還元反応等についても触媒作用のあることが見出された。²⁵ 今日では、CD の水酸基を位置特異的に他の官能基で修飾する方法も開発されつつあり、²⁶ 修飾 CD を用いてさらに高度な人工酵素とする研究が活発に行われている。²⁷

本論文では CD の包接能と触媒能に着目し、これを酵素型反応に応用することを目的としていくつかの修飾 CD を合成した。以下の第 2 章では、 α -キモトリプシンのような加水分解酵素型の反応を構築するために、溶液内での 2-アルキル置換イミダゾールの一般酸-塩基触媒作用を観察した。第 3 章ではイオン性 CD の包接挙動から複合体形成における静電的な効果を調べた。第 4 章ではイミダゾールと CD の共存系での酵素型反応を行った。第 5 章でイミダゾールやグリシンを導入した修飾 CD による酵素型反応の構築を図り、最後の第 6 章ではグリシン修飾 CD の銅錯体から成る高度な系を構築し、人工酵素となる CD の包接および触媒作用についての新たな知見を得るべく検討した。

1-3 参考文献

- (1) P. D. Boyer, *The Enzymes*, vol. I and II, Academic Press, New York, 1970; M. Dixon and E. C. Webb, *Enzymes*, Longman, London, 1979; A. R. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman, New York, 1984; C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman, San Francisco, 1979.
- (2) T. C. Bruice and S. J. Benkovic, *Bioorganic Mechanisms*, vol. I and II, Benjamin, New York, 1966; W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969; M. L. Bender, *Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Proton to Proteins*, Wiley-Interscience, New York, 1971; A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1980, **17**, 183; A. J. Kirby, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 290; F. M. Menger, *Acc. Chem. Res.*, 1985, **18**, 128; K. N. Houk, J. A. Tucker and A. E. Dorgio, *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**, 107.
- (3) D. M. Blow, J. J. Birktoft and B. S. Hartley, *Nature*, 1969, **221**, 337; D. M. Blow, *Acc. Chem. Res.*, 1976, **9**, 145; D. G. Govenstein and K. Tira, *Biophys. J.*, 1984, **46**, 749; H. Dutler and S. A. Bizzozero, *Acc. Chem. Res.*, 1989, **22**, 322; W. W. Bachovchin and J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 8041.
- (4) D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*, 2nd ed., Wiley, New York, 1995.
- (5) A. J. Kirby, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 551.
- (6) R. C. Hayward, *Chem. Soc. Rev.*, 1983, **11**, 285; J. M. Lehn, *Science*, 1985, **227**, 849; J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1990, **29**, 1417; H. J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991, **30**, 1417; J. Rebek, Jr., *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**, 399; D. J. Cram, *Container Molecules and their Guests*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994; M. C. T. Fyfe and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 393.
- (7) P. G. Schultz and R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.*, 1993, **26**, 391; J. D. Stewart, L. J. Liota and S. J. Benkovic, *Acc. Chem. Res.*, 1993, **26**, 396; M. M. Mader and P. A. Bartlett, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1281.

- (8) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.*, 1980, **13**, 170; J. Rebek, Jr., *Acc. Chem. Res.*, 1984, **17**, 258; I. Tabushi, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 269.
- (9) *Bioorganic Chemistry*, vol. I – IV, ed. E. E. van Tamelen, Academic Press, New York, 1977; M. I. Page and A. Williams, *Enzyme Mechanisms*, The Royal Society of Chemistry, London, 1987; H. Dugas, *Bioorganic Chemistry*, 3rd ed., Springer-Verlag, New York, 1996.
- (10) W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1980, **19**, 344; M. L. Bender and M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, New-York, 1978; J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic, Dordrecht, 1988.
- (11) A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 1891, **112**, 536.
- (12) F. Schardinger, *Wien. Klin. Wochenschr*, 1904, **17**, 207.
- (13) K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, *Ber. Dtsh. Chem. Ges.*, 1938, **71**, 1596.
- (14) D. French and M. L. Levine, J. H. Patur and E. Norberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 353; F. Cramer and F. M. Henglein, *Chem. Ber.*, 1957, **90**, 2561.
- (15) J. Szejtli, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1743; A. R. Hedges, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 2013; K. Uekama, F. Hirayama and T. Irie, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 2045; K. H. Fromming and J. Szejtli, *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic, Dordrecht, 1994; S. Li and W. C. Purdy, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 1457.
- (16) P. C. Manor and W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 3630.
- (17) K. Harata, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1803.
- (18) W. C. Cromwell, K. Bystrom and M. R. Eftink, *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 326; I. Sanemasa, T. Osajima and T. Deguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, **63**, 2814; R. Breslow, M. F. Czarniecki, J. Emert and H. Hamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 762.
- (19) R. Dyllick-Brenzinger and J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 1166; H. Dodziuk, J. Sitkowski, L. Stefaniak, J. Jurezak and D. Sybilska, *Chem. Commun.*, 1992, 207.

- (20) K. A. Connors, *Binding Constants*, Wiley-Interscience, New York, 1987.
- (21) Y. Matsui, T. Nishioka, T. Fujita, *Top. Curr. Chem.*, 1985, **128**, 61; K. A. Connors, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1325.
- (22) F. Cramer and W. Dietsche, *Chem. Ber.*, 1959, **92**, 1739.
- (23) R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3242; R. L. VanEtten, G. A. Clowes, J. F. Sebastian and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3253.
- (24) F. Cramer and G. Mackensen, *Chem. Ber.*, 1970, **103**, 2138.
- (25) K. Takahashi, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 2013.
- (26) A. P. Croft and R. A. Bartsch, *Tetrahedron*, 1983, **39**, 1417; G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 803; A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine and V. T. D'Souza, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1977.
- (27) I. Tabushi, *Acc. Chem. Soc.*, 1982, **15**, 66; V. T. D'Souza and M. L. Bender, *Acc. Chem. Soc.*, 1987, **20**, 141; R. Breslow, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 146; R. Breslow and S. D. Dong, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1997.

第2章 エステル加水分解におけるイミダゾールの一般塩基および酸触媒作用

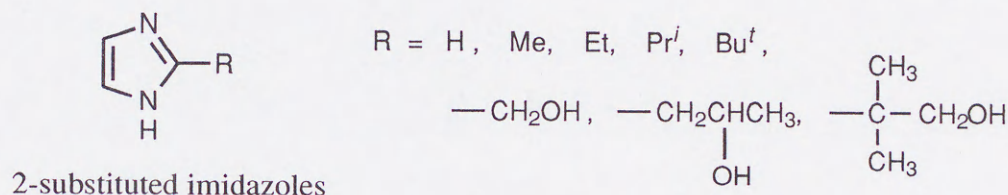
タンパク質加水分解酵素 α -キモトリプシンの活性中心では、His-57 のイミダゾール基が Ser-195 のプロトンを引き抜いたり、アシル酵素中間体生成のときにアミン成分へ脱離するプロトンを供与する一般塩基および酸触媒として作用することが考えられている。このようなイミダゾールの触媒作用はパパインやリボヌクレアーゼ等、他の酵素についても見つけられている。¹ しかしながら、イミダゾールの触媒作用についての研究のほとんどは、フェノキシアニオンのような脱離性の良い基を持つ芳香族エステルの加水分解に対する求核触媒作用についてであり、一般触媒作用についての研究は少ない。²

酵素活性中心におけるイミダゾール基は電子的、親水的、疎水的および立体的な効果などが同時に作用している特殊な環境下であり、イミダゾールの触媒作用に及ぼすこれらの効果を溶液反応で調べることは重要なことである。そこで本章では、アルキルおよびヒドロキシアルキル基をイミダゾール上の 2 位に持つ 2-置換イミダゾール類を用いて、これらの置換基がイミダゾールの一般酸-塩基触媒作用に及ぼす立体的影響や極性の効果を明らかにしようとした。イミダゾール上の 2 位の置換基は、その置換基効果を調べるのに適していることがすでに報告されている。³ なお、基質にはイミダゾールの一般塩基触媒作用を受けて加水分解するジクロロ酢酸エチル⁴ と、カルボン酸類の一般酸触媒作用によって加水分解するジエチルフェニルオルトホルメート⁵ を使用した。

2-1 実 験

使用試薬

それぞれの基質は、市販品を蒸留後使用した（ジクロロ酢酸エチル：b p 67—68 °C/31mmHg、 n_D^{20} 1.4383；ジエチルフェニルオルトホルメート：b p 93 °C/3mmHg、 n_D^{20} 1.4796）。アルキル置換イミダゾール（Scheme 1）は市販品であり、ヒドロキシアルキル置換体は既知の方法⁶で合成した。また、これらのイミダゾール類は触媒を兼ねた緩衝剤として用い、その調製は置換イミダゾール塩基水溶液に 1 mol l⁻¹ 塩酸水溶液を加えて、部分的に中和して行った。



Scheme 1

速度測定で用いたアセトニトリルは市販のスペクトル用純溶媒を、ジオキサンは通常の方法⁷で精製した。水は脱イオン交換したものを2度蒸留して用いた。重水は Merk 社の 99.75%のものである。以後の章においても速度測定で用いたアセトニトリル、ジオキサンおよび水はこれと同じである。

速度測定

ジクロロ酢酸エチルの加水分解反応は、一定温度の 25 ml 各種イミダゾール緩衝液に基質の 0.6 mol l⁻¹ のアセトニトリル溶液 0.125 ml を加えて開始した。一定時間毎に反応液の一部分を採取し、残存するエステルをヒドロキサム酸—鉄法⁴

によって 540 nm での吸光度 (日立 200 型分光光度計) から定量した。

ジエチルフェニルオルトホルメートの加水分解反応は、50%(v/v) ジオキサン水溶液を溶媒として、一定温度の 3 ml イミダゾール緩衝液を入れたセル中に 0.02 mol l⁻¹ 基質アセトニトリル溶液 15 μ l を加えて行ない、生成するフェノールの 272.3 nm での吸光度変化 (日立 100-50 型分光光度計) から反応を追跡した。

時間 t での吸光度を A_t 、半減期の 10 倍以上の時間での吸光度を A_∞ として、時間に対する $\ln(|A_\infty - A_t|)$ のプロットの傾きから、基質の分解反応で観察される擬一次速度定数 k_{obs} を求めた。測定はそれぞれ 2 回以上行い、 k_{obs} の測定誤差はジクロロ酢酸エチルの加水分解については $\pm 8\%$ 、ジエチルフェニルオルトホルメートの加水分解については $\pm 5\%$ 以下であった。さらに、温度や緩衝液濃度を変えて同様に測定し、いくつかの置換イミダゾールについては緩衝比、すなわちイミダゾール塩基 Im とイミダゾリウムイオン ImH^+ の割合を変えて ($[\text{Im}] : [\text{ImH}^+] = 3 : 1 - 1 : 9$) 行った。また、ジエチルフェニルオルトホルメートの加水分解では、重水溶媒同位体効果を調べるために溶媒を 50%(v/v) ジオキサン— D_2O としても測定した。

2-2 結 果

イミダゾール緩衝液中のイミダゾール塩基とイミダゾリウムイオンによる一般塩基および一般酸触媒作用を受ける基質分解反応の k_{obs} は、(1) 式のように緩衝液全濃度 $[\text{Im}]_t$ に比例し、さらにそれぞれの塩基および酸成分の濃度に比例することになる。⁸ ここで、 $[\text{Im}]_t = [\text{Im}] + [\text{ImH}^+]$ であり、 k_0 は溶媒中の化学種による無触媒の速度定数、 $k_{[\text{Im}]_t}$ はイミダゾール緩衝剤による触媒速度定数、そして k_{im} と k_{imH^+} は緩衝液中のイミダゾール塩基およびイミダゾリウムイオンによる触媒速度定数である。

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{[\text{Im}]_t} [\text{Im}]_t = k_0 + k_{\text{im}} [\text{Im}] + k_{\text{imH}^+} [\text{ImH}^+] \quad (1)$$

求められた k_{obs} の値はどちらの基質においても $[\text{Im}]_t$ の増大とともに増加し、イミダゾールによる触媒作用が観察された。さらに緩衝比を変えて行った実験から、(1)式を変形した(2)式によって k_{im} と k_{imH^+} をそれぞれ求めることができる。

$$\frac{(k_{\text{obs}} - k_0)}{[\text{Im}]_t} = k_{\text{im}} \frac{[\text{Im}]}{[\text{Im}]_t} + k_{\text{imH}^+} \frac{[\text{ImH}^+]}{[\text{ImH}]_t} \quad (2)$$

いくつかの置換イミダゾール緩衝液について、その塩基あるいは酸成分の割合に対する $(k_{\text{obs}} - k_0)/[\text{Im}]_t$ のプロットを Figure 1 と 2 に示す。これらのプロットでは、どちらの基質についても原点を通る良好な直線関係が得られた。このことから、ジクロロ酢酸エチルの加水分解ではイミダゾール塩基のみが一般塩基触媒として、そしてジエチルフェニルオルトホルメートの加水分解ではイミダゾリウムイオンのみが一般酸触媒として作用していることがわかった。したがって、イミダゾール緩衝液中の塩基成分濃度および酸成分濃度に対する k_{obs}

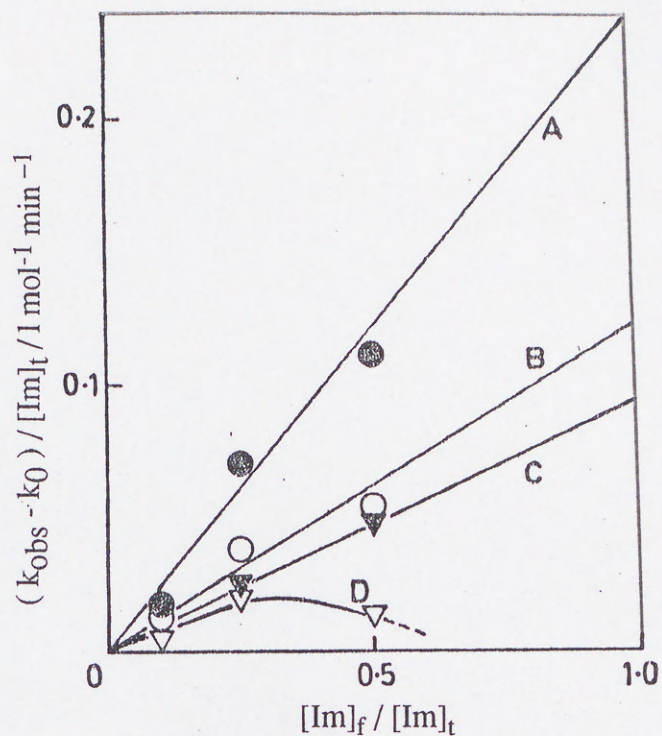


Figure 1. Plots of $(k_{obs} - k_0) / [Im]_t$ versus fraction of free base concentration of imidazoles: A, 2-methylimidazole; B, 2-ethylimidazole; C, 2-(2-hydroxy-propyl)-imidazole; D, 2-isopropylimidazole.

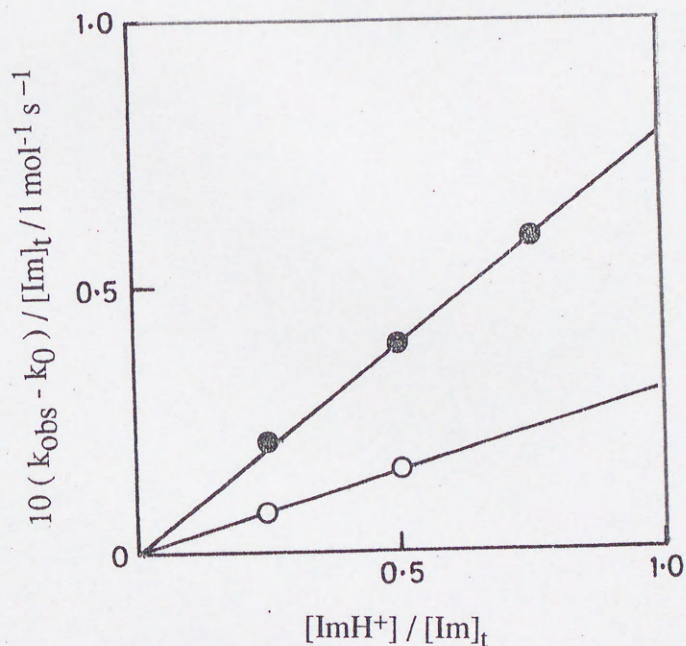


Figure 2. Plots of $(k_{obs} - k_0) / [Im]_t$ versus fraction of imidazolium ion concentration: ●, imidazole; ○, 2-methylimidazole.

のプロットから(3)式および(4)式によって k_{im} と k_{imH^+} をそれぞれ算出した。

$$\text{一般塩基触媒作用: } k_{obs} = k_0 + k_{im} [Im] \quad (3)$$

$$\text{一般酸触媒作用: } k_{obs} = k_0 + k_{imH^+} [ImH^+] \quad (4)$$

なお、Figure 1 のイソプロピル置換体については、その疎水性による会合によって 0.5 mol l^{-1} 付近からプロットが屈曲したため、低濃度領域について k_{im} を計算した。緩衝比 1:1 での各 2-置換イミダゾールについて得られたこれらの値を Table 1 と 2 にまとめた。さらに、 k_{im} および k_{imH^+} の温度変化から反応の活性化パラメーターを求め、その結果を Table 3 および 4 に示した。

Table 1 Substituted imidazole catalyzed hydrolysis of ethyl dichloroacetate in water ^{a)}

Imidazole		pKa ^{b)}	10 ² k _{im} / l mol ⁻¹ min ⁻¹		
substituent			20 °C	30 °C	40 °C
1	2-H ^{c)}	7.11	6.5	9.4	
2	2-HOCH ₂	6.73		5.7	
3	2-Me	8.10	14	22	35
4	2-HOCH(Me)CH ₃	7.53	5.8	9.3	15
5	2-Et	7.94		10	
6	2-Pr ⁱ ^{d)}	7.90	3.9	8	9.8
7	2-HOCH ₂ C(Me) ₂ ^{e)}	7.58		4.6	9.3

^{a)} Ionic strength 1.0 (KCl). ^{b)} Taken as the pH of the half-neutralized buffer solution in water at 30 °C and ionic strength 0.1. ^{c)} At 10 °C 10² k_{im} = 3.0 l mol⁻¹ min⁻¹.

^{d)} At 25 °C 10² k_{im} = 6.0 l mol⁻¹ min⁻¹. ^{e)} At 48 °C 10² k_{im} = 12 l mol⁻¹ min⁻¹.

Table 2 Substituted imidazole catalyzed hydrolysis of diethyl phenyl orthoformate in 50% dioxane-water (v/v) ^{a)}

Imidazole		pKa ^{b)}	10 ² k _{imH⁺} / l mol ⁻¹ s ⁻¹		
substituent			30 °C	35 °C	40 °C
1	2-H ^{c)}	6.40	7.74	10.8	15.6
			3.74		
2	2-Me	7.34	3.05		
3	2-Et	7.31	3.13		
4	2-HOCH(Me)CH ₃	7.06	3.25		
5	2-Pr ⁱ	7.20	2.56	4.00	6.11
6	2-Bu ⁱ	7.10	1.97		
7	2-HOCH ₂ C(Me) ₂	6.99	1.64	2.68	3.80

^{a)} Ionic strength 1.0 (KCl). ^{b)} Taken as the pH of the half-neutralized buffer solution in 50% dioxane-water at 30 °C and ionic strength 0.1. ^{c)} At 10 °C 10² k_{imH⁺} = 5.07 l mol⁻¹ min⁻¹.

Table 3 Activation parameters for substituted imidazole catalyzed hydrolysis of ethyl dichloroacetate in water ^{a)}

Imidazole substituent	$\Delta H^\ddagger /$ kcal mol ⁻¹	$\Delta S^\ddagger /$ cal mol ⁻¹ K ⁻¹
2-H	9.1	-41
2-Me	7.8	-44
2-HOCH(Me)CH ₃	8.7	-45
2-Pr ⁱ	7.5	-47
2-HOCH ₂ C(Me) ₂	9.6	-41

^{a)} Calculated with second-order rate constants in l mol⁻¹ s⁻¹ at 25 °C.

Table 4 Activation parameters for substituted imidazole catalyzed hydrolysis of diethyl phenyl orthoformate in 50% dioxane-water ^{a)}

Imidazole substituent	$\Delta H^\ddagger /$ kcal mol ⁻¹	$\Delta S^\ddagger /$ cal mol ⁻¹ K ⁻¹
H	13	-20
2-Pr ⁱ	16	-14
2-HOCH ₂ C(Me) ₂	16	-15

^{a)} Calculated with second-order rate constants in l mol⁻¹ s⁻¹ at 25 °C.

2-3 考 察

2-3-1 一般塩基触媒作用

用いた 2-置換イミダゾールについてはジクロロ酢酸エチルの加水分解における一般塩基触媒作用は報告されていない。しかし、Figure 1 のプロットから置換イミダゾール塩基が触媒活性種であることや、Table 1 の k_{im} の値が置換基によってそれほど大きく変化しないことは、これらの置換イミダゾールも一般塩基触媒として作用していることを示すものである。そしてこの触媒作用は、Table 3 の活性化エンタルピー ΔH^\ddagger と活性化エントロピー ΔS^\ddagger の値が酢酸シクロペンチルの加水分解で得られているイミダゾールの一般塩基触媒作用についての値 2a と同程度であることや、 ΔS^\ddagger の値が基質と触媒と水分子を伴う 3 分子反応に典型的な負の大きな値であることから確認された。

Table 1 の k_{im} の値はイミダゾール上の置換基のかさ高さには依存していないように見える。これはおそらく、各置換イミダゾールの pK_a が異なるためと考えられる。そこで置換基の立体効果を評価するために、これら全ての置換イミダゾールが同一の pK_a を持つと仮定して比較することにした。一般に、塩基触媒についての速度定数 k と触媒の pK_a との間には(5)式で表される Brönsted の触媒則が成立する。

$$\log k = \beta pK_a + \text{constant} \quad (5)$$

イミダゾールを含む各種塩基によるジクロロ酢酸エチルの加水分解の Brönsted 定数 β は 0.47 であることが報告されている。⁴ 用いた全ての置換イミダゾール

が同一の反応機構による一般塩基触媒として作用し、これらの置換イミダゾールが(5)式で同じ β 値を持つ Brönsted 式に従うと仮定し、 pK_a に対する $\log k_{im}$ の平行 Brönsted プロット (Figure 3) を行った。用いた置換イミダゾールの平均の pK_a 値である 7.80 のところで各々の補正された触媒速度定数 R_X を計算し、求めた R_X と $\log (R_X/R_H)$ の値を Table 5 に示した。反応に及ぼす置換基の立体効

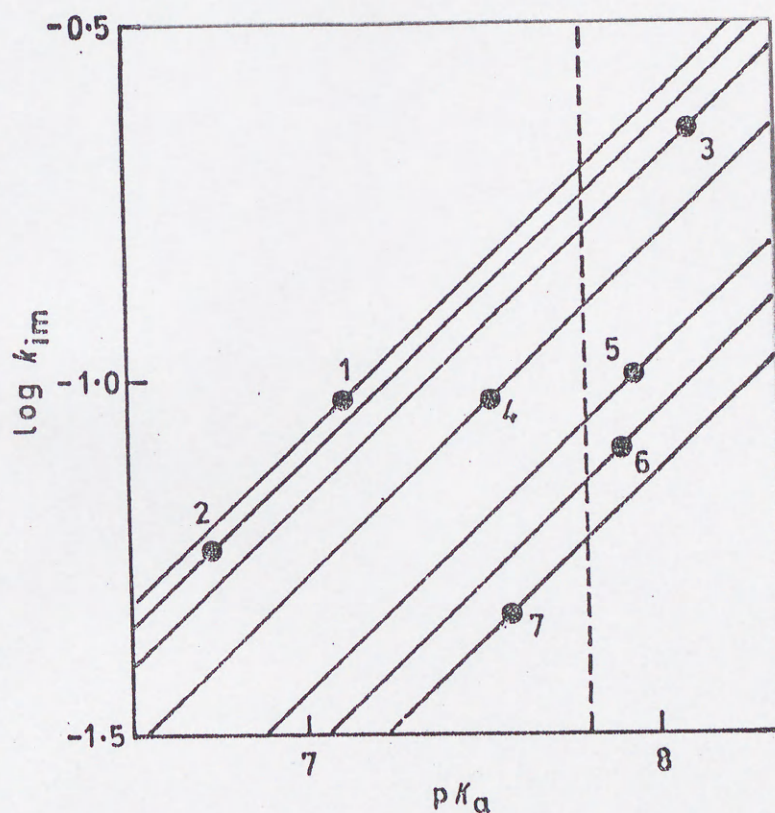


Figure 3. Parallel Brönsted plots to provide extrapolated rate values of substituted imidazoles with a hypothetical pK_a of 7.80. A common slope of 0.47 is assumed. For key, see Table 1.

Table 5 Extrapolated rate values of substituted imidazoles with a hypothetical pKa of 7.80 for the hydrolysis of ethyl dichloroacetate

	Imidazole substituent	$10^2 R_X /$ $l \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$-\log(R_X / R_H)$
1	2-H	20	0
2	2-HOCH ₂	18	0.034
3	2-Me	16	0.090
4	2-HOCH(Me)CH ₃	13	0.20
5	2-Et	8.7	0.36
6	2-Pr ⁱ	7.2	0.44
7	2-HOCH ₂ C(Me) ₂	5.9	0.53

果の尺度は、基準となる無置換のイミダゾールについての速度定数を R_H として (6)式で与えられ、Taft の置換基立体パラメーター E_s ⁹ に依存する。

$$\text{立体効果の尺度} = \log(R_X / R_H) = \delta E_s \quad (6)$$

δ は立体効果の受けやすさを示す反応定数で、Figure 4 に示した E_s に対する $\log(R_X / R_H)$ のプロットから見積もられる。ヒドロキシアルキル基については便宜的に対応するアルキル基と同じ E_s の値を持つとして別にプロットしたが、アルキル基についてと同じく傾き $\delta = 0.26$ の直線に近似できる。この δ の値はイミダゾール一般塩基触媒作用における基質上の置換基の立体効果について報告されている値 ($\delta = 0.49$)^{2d} に比べてやや小さいが、同じ置換イミダゾール類による求核触媒作用で得られた値 ($\delta = 1.33$)⁶ よりもはるかに小さい。このように、Table 1 の k_{im} の違いは先に推定したように pKa の差によるものであり、イミダゾール上の置換基の立体効果は小さなものである。

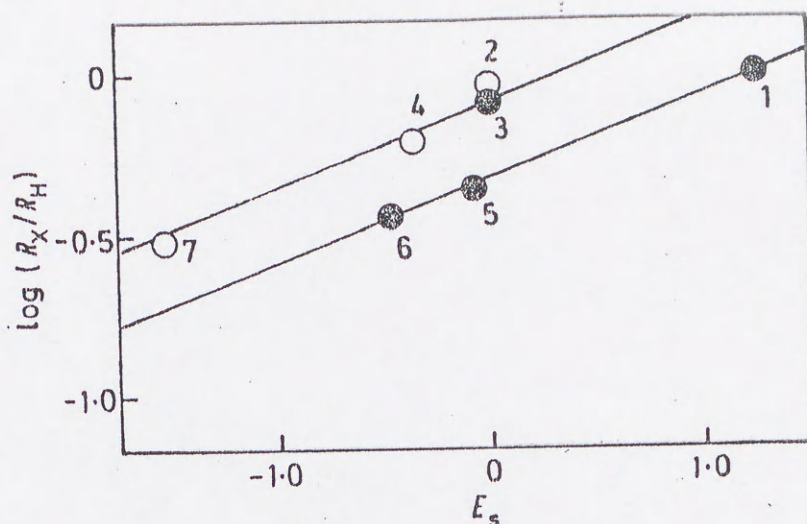


Figure 4. Plots of (R_X/R_H) versus Taft E_s parameter: E_s values are given in ref. 9; hydroxyalkyl groups (○) are tentatively plotted on the same scale as the corresponding alkyl groups (●). For key, see Table 1.

Figure 4 からわかるように、水酸基を持つものは対応するアルキル置換体のものよりも反応をいくらか促進しており、これは速度定数で 1.7 倍の速度増加に相当していることが計算される。エステル加水分解での反応点に隣接した水酸基による促進の原因として、誘起効果¹⁰や水素結合¹¹、酸-塩基触媒作用¹²、求核反応¹³、微視的溶媒効果¹⁴などが提起されている。今回の反応ではイミダゾール基が一般塩基触媒として作用し、水酸基の誘起効果はイミダゾールの pK_a に反映されている。したがって、水酸基による促進効果はアルキル基の疎水性を緩和し、反応の遷移状態で必要とされる水分子をイミダゾール窒素に近づけるような微視的溶媒効果として説明できる。

ここで得られた小さな立体効果と水酸基による促進効果は、イミダゾール上の置換基が反応の遷移状態にある程度まで関与していることを意味しており、その遷移状態の構造は“緩んだ”ものであると言える。

2-3-2 一般酸触媒作用

Figure 2 のプロットは、イミダゾール緩衝液中の酸成分が反応活性種であることを示し、Table 2 の k_{imH^+} についての約 2 の重水溶媒同位体効果¹⁵ からイミダゾリウムイオンが一般酸触媒として作用していることは明らかである。また、Table 4 の活性化パラメーターの値はニトロフェノキシオキサデカリンの加水分解におけるクロロギ酸の一般酸触媒作用について得られている値 ($\Delta H^\ddagger = 17.6$ kcal mol⁻¹、 $\Delta S^\ddagger = -14.7$ cal K⁻¹ mol⁻¹)¹⁶ と類似しており、 ΔS^\ddagger の値も遷移状態で 2 から 3 分子を伴う反応に相当するもの¹⁷ である。

Table 2 に示した 30℃での k_{imH^+} の値は、ほぼ置換基のかさ高さの順に減少し、オルトエステルの加水分解はイミダゾール上の置換基による立体効果を受けていることがわかる。その程度は一般塩基触媒作用についてと同じように小さく、もっともかさ高い Bu^t でも無置換のものの 5 分の 1 までにしか k_{imH^+} は減少していない。しかしながら、水酸基による効果は現れていないようである。一般酸触媒作用における置換基の立体効果を評価するにあたり、今回用いた溶媒中では置換イミダゾール類の pKa の範囲が狭いことから前節のような平行 Brönsted プロットによる速度定数の補正は行わなかった。ここでは立体効果の反応定数 δ 値を求めるために、無置換のイミダゾールの k_{imH^+} を基準 ($k_{\text{imH}^{+\circ}}$) として、Taft の Es に対し $\log(k_{\text{imH}^+}/k_{\text{imH}^{+\circ}})$ をプロットした (Figure 5)。このプロットから得られた直線の傾き δ は 0.22 となり、一般塩基触媒作用についての値 0.26 に近いものになった。

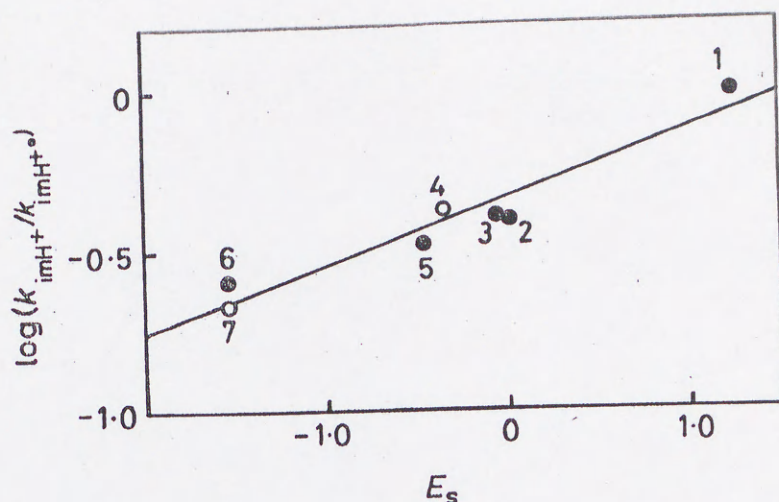
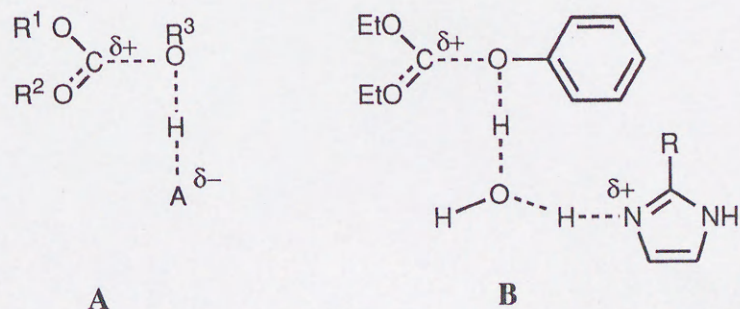


Figure 5. Plot of $\log(k_{\text{imH}^+}/k_{\text{imH}^+^\circ})$ versus Taft E_s parameter: E_s values are given in ref. 9; hydroxyalkyl groups (○) are tentatively plotted on the same scale as the corresponding alkyl groups (●). For key, see Table 2.

オルトエステルやアセタール、ケタールなどの一般酸触媒による加水分解の遷移状態は、以前から Scheme 2A のような構造であると考えられてきた。¹⁵ もしも、基質中の脱離基へのプロトン移動がそのように酸から直接的に起こるのであれば、その置換基の立体効果は大きく現れ、求核反応の場合に近くなるはずである。一般酸触媒作用について今回初めて求められたこの小さな δ 値は、遷移状態での ImH^+ から基質オルトエステルへのプロトン移動が Scheme 2B に示した水分子を介する間接的なものであることを示唆している。



Scheme 2

Scheme 2B の機構では間に入った水分子が電荷の非局在化によって遷移状態を安定にし、水素結合によってプロトン移動を促進するように作用している。実際、水媒体中の多くのプロトン移動反応が、溶媒水分子の関与したものであることが知られている。¹⁸

結果として、2-アルキルおよびヒドロキシアルキル置換イミダゾール類を用いたジクロロ酢酸エチルの加水分解反応から、溶媒水分子を伴うイミダゾールの一般塩基触媒作用は置換基の立体効果を受けにくく、その遷移状態は“緩んだ”構造であり、アルキル置換基中の水酸基は、微視的溶媒効果によって反応をわずかに促進することがわかった。また、オルソエステルの加水分解におけるこれら置換イミダゾールによる一般酸触媒作用は置換基の立体効果を受けにくく、その程度は一般塩基触媒作用についての場合をも下回るものだった。このことから、その遷移状態におけるプロトン移動が、一般酸としてのイミダゾリウムイオンから基質との間に水分子を介するような間接的なものであることを新たに提起した。

2-4 参考文献

- (1) G. Lowe and Y. Yuthavong, *Biochem. J.*, 1971, **124**, 117; M. H. O'Leary, M. Urberg and A. P. Yung, *Biochemistry*, 1974, **13**, 2077; D. Findlay, D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin and C. A. Ross, *Nature*, 1961, **190**, 781.
- (2) General base catalysis: (a) T. C. Bruice, T. H. Fife, J. J. Bruno and P. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3012; (b) M. Komiyama and M. L. Bender, *Bioorg. Chem.*, 1977, **6**, 13; (c) J. B. Jonse and K. E. Taylor, *Can. J. Chem.*, 1977, **55**, 1653; (d) J. B. Milstein and T. H. Fife, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 2164; (e) G. M. Blackburn and H. L. Dodds, *J. Chem. Soc. (B)*, 1971, 826; (f) M. Utaka, J. Koyama and A. Takeda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 984; (g) M. Komiyama, T. R. Roesel, M. L. Bender, M. Utaka and A. Takeda, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, **74**, 23; (h) M. Komiyama, M. L. Bender, M. Utaka and A. Takeda, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, **74**, 2634;
- General acid catalysis: (i) T. H. Fife, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 4597; (j) R. A. Atkinson and T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 819; (k) T. Okuyama, S. Kawano and T. Fueno, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 4372.
- (3) T. C. Bruice and G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 148; A. R. Butler and I. H. Robertson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1975, 660.
- (4) W. P. Jencks and J. Carriuolo, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 1743.
- (5) E. Anderson and T. F. Fife, *J. Org. Chem.*, 1972, **37**, 1993.
- (6) M. Akiyama, Y. Hara and M. Tanabe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1978, 288.
- (7) D. D. Perrin, W. L. F. Armarego and D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, 1980.
- (8) W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, p. 163, McGraw-Hill, New York, 1969.
- (9) R. W. Taft, *Steric Effects in Organic Chemistry*, p. 556, ed. M. S. Newman, Wiley, New York, 1956.

- (10) T. C. Bruice, T. H. Fife, J. J. Bruno and P. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 3012.
- (11) S. M. Kupchan, J. H. Block and A. C. Isenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 1189.
- (12) E. L. Killian and M. L. Bender, *Tetrahedron Lett.*, 1969, 1255.
- (13) B. Capon, S. T. McDowell and W. V. Raftery, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1973, 1118.
- (14) B. Capon and M. I. Page, *J. Chem. Soc. (B)*, 1971, 741; T. C. Bruice and T. H. Fife, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **82**, 1973.
- (15) T. H. Fife, *Acc. Chem. Res.*, 1972, **5**, 264; T. H. Fife, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1975, **11**, 81; E. H. Cordes and H. G. Bull, *Chem. Rev.*, 1974, **74**, 581.
- (16) S. Chandrasekhar, A. J. Kirby and R. J. Martin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1983, 1619.
- (17) W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, p. 163, McGraw-Hill, New York, 1969.
- (18) E. Grunwald and D. Enstace, *Proton Transfer Reactions*, ch. 4, ed. E. Caldin and V. Gold, Chapman and Hall, London, 1975.

第3章 イオン性シクロデキストリンの包接挙動

シクロデキストリンの最大の特徴は包接能を持っていることであり、本研究では、この包接能を利用してシクロデキストリンを酵素型反応における基質取り込みのための部位にすることを目的としている。シクロデキストリンが基質（ゲスト分子）を包接するときの結合の駆動力には、疎水性相互作用やファンデルワールス力、水素結合、高エネルギー水分子の放出、ひずみエネルギーの解除などがある。またこれらの作用の中には極性（静電的）相互作用も含まれるが、その寄与は小さいと言われている。¹ しかしながら、この極性相互作用を十分に活用することは、酵素型反応に用いるシクロデキストリンの分子認識能を高めたり、制御したりするひとつの手段として重要であると考えられる。

本章では、電荷を有するイオン性シクロデキストリンの、イオン性ゲスト分子に対する包接挙動を観察し、これらのイオン性分子間の極性相互作用がシクロデキストリンの包接能に及ぼす効果を明らかにしようとした。そこで、カチオン性のホストとしてシクロデキストリンの一級水酸基の一つをアミノ基に置換した修飾シクロデキストリン（CD-NH₂）を、一方アニオン性のホストとしてチオグリコール酸を導入した修飾シクロデキストリン（CD-SCH₂COOH）を合成した。そして、これらのイオン性修飾シクロデキストリンと、イオン性のゲスト分子である *p*-ニトロフェノール（PNP）およびケイ皮酸（CA）との複合体形成を調べた。 PNP と CA の pKa はそれぞれ 7.1 と 4.5 であり、ホストの CD-

NH_3^+ と $\text{CD-SCH}_2\text{COOH}$ の pK_a は 10.4 と 3.8 と予想される。² そのため、溶液の pH を適当に変えることによってそれぞれの分子を帯電させることができる。したがって、包接複合体を生じるホストとゲスト分子との結合定数の値をいろいろな pH 条件のもとで算出し、これらの値を比較することから包接に及ぼす極性効果を見積もることにした。

3-1 実 験

使用試薬

シクロデキストリン (CD) は日本食品化工(株)の β 型を水から再結晶し、減圧乾燥して用いた。他の試薬類は市販品をそのまま用いた。

次の各修飾 CD の合成や物性測定で用いた装置は以下の通りである。

HPLC (分析用) ポンプ：日本分光 TRI ROTAR-III および Waters M600

カラム：東ソー TSK GEL ODS-80TM 4.6 mm ϕ \times 250 mm

検出器：日本分光 UVIDEC 100-IV UV 検出器 および

昭和電工 SE-51 示差屈折率検出器

HPLC (分取用) ポンプ：Waters M600

カラム：東ソー TSK-GEL ODS-80TM 20 mm ϕ \times 250 mm

検出器：ISCO V⁴ UV 検出器 および

昭和電工 SE-52 示差屈折率検出器

NMR：日本電子 JNM-GX 500 および Varian Gemini 200

IR：日本分光 A-702 および 島津 FTIR-8500

pH 滴定：Radiometer RTS-822 自動滴定装置 および ORION SA-720 pH 計

TLC：Merk Kieselgel 60F₂₅₄ (展開溶媒 BuOH/EtOH/H₂O = 5/4/3)

(検出液 *p*-anisaldehyde/H₂SO₄/AcOH/MeOH = 1/10/20/200)

6-deoxy-6-(*p*-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (CD-OTs)

Hattori らの方法³ に準じてアルカリ水溶液中での C-6 位モノトシル化を行った。

0.25 mol l⁻¹ NaOH 水溶液 1000 ml に CD (20 g, 17 mmol) を溶かし、0 から 5 °C でよく粉碎した TsCl (34 g, 176 mmol) を加え、5 分間激しく攪拌した。反応混合物をろ過し、ろ液を濃塩酸で中和し、冷蔵庫に一晩放置後、析出した白色結晶をろ取し、ろ過物を水から再結晶して標題化合物 (4.6 g, 21%) を得た。

TLC R_f = 0.50, HPLC R_t = 10.2 min (ODS-80TM, 15% aq. CH₃CN 0.8 ml min⁻¹)

6-deoxy-6-amino-β-cyclodextrin (CD-NH₂)

Melton らの方法⁴に従って、CD-OTs (1.8 g, 1.4 mmol) と NaN₃ (1.8 g, 43 mmol) を 90 °C の水中で 90 分間攪拌した。反応溶液を約 10ml まで減圧濃縮し、これに 1 ml のテトラクロルエタンを加えた。析出した白色結晶をろ過し、得られたろ過物を水 100ml に溶かし、これに Pd/C を触媒として加え、室温で 15 時間接触水素化を行った。反応混合物をろ過し、ろ液を減圧濃縮し残査を水から再結晶して、標題化合物 (0.38 g, 23%) を得た。

6-deoxy-[6-(carboxymethyl)thio]-β-cyclodextrin (CD-SCH₂COOH) Na 塩

Tabushi らの方法⁵を参考にし、以下のようにして合成した。無水 EtOH 中でチオグリコール酸 (0.93 g, 8 mmol) とナトリウムエチラート (0.62 g, 9 mmol) で処理して得られたチオグリコール酸 Na 塩と、CD-OTs (2.13 g, 2 mmol) を無水 DMF 80 ml に溶かし、アルゴンガス雰囲気下、60 °C で 2 時間反応させた。溶媒を減圧下で留去し、残査を水 10ml に溶解し、EtOH 200 ml 中に注いだ。析出した沈殿をろ過し、その結晶を数 ml の水に溶かしてポリスチレンゲルカラム (日本練水 HP-20) に通し、水 2 l を溶出液として未反応の CD-OTs を除いた。続い

て分取高速液体クロマトグラフィー (Rt 24.3 min, ODS-80TM, 3%aq. CH₃CN 15 ml min⁻¹) で精製し、標題化合物 (0.78 g, 39%) を得た。

TLC R_f = 0.38, HPLC R_t = 9.7 min (ODS-80TM, 0.8% aq. CH₃CN 0.8 ml min⁻¹)

IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3370, 2940, 1650, 1580, 1390, 1160, 1040, 950.

¹³C-NMR (50 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 37.6(C-6'), 41.9(CH₂), 64.6(C-6), 75.1(C-5'), 76.1(C-5), 76.3(C-3), 77.4(C-2), 85.5(C-4), 88.6(C-4'), 106.0(C-1'), 106.2(C-1), 182.3(C=O).

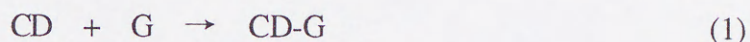
複合体生成の観察と結合定数の算出

CD ホストとゲスト分子との複合体生成は、UV スペクトル法⁶によって観察した。このとき用いた pH 緩衝液は、pH 10 (0.1 mol l⁻¹ 炭酸緩衝溶液、pH = 10.0)、pH 7 (0.1 mol l⁻¹ リン酸緩衝溶液、pH = 6.9)、および pH 2 (0.1 mol l⁻¹ HCl/KCl 緩衝溶液、pH = 2.0) である。25 °Cで、これらの緩衝液中、PNP および CA の濃度を 2×10⁻⁵ mol l⁻¹ とし、イオン性 CD を 0 から 2.5×10⁻³ mol l⁻¹ にしたときのゲスト分子の UV スペクトルの変化を記録した。同様に、CD についても行なった。

3-2 結 果

Figure 1 は pH 7 の緩衝液中、PNP にいろいろな濃度の CD-NH₂ を加えたときに得られた溶液の UV スペクトルの変化である。CD-NH₂ の濃度増加に伴って PNP のスペクトルは変化し、包接複合体を形成していることがわかる。CD-SCH₂COOH についても類似したスペクトル変化が観察された。また CA についても、イオン性 CD ホストを加えることによって同様にスペクトルは変化した。

そこで一定波長での吸光度の変化から複合体生成の結合定数 K を次のようにして算出した。⁶ (1)式に示すように CD とゲスト分子 (G) が 1:1 の複合体 (CD-G) を形成するとき、CD ホストとゲスト分子の結合定数 K は (2) 式で表わされる。得られたスペクトルのある波長における吸光度の変化 ΔA は、各化学



$$K = [\text{CD-G}] / ([\text{CD}] \cdot [\text{G}]) \quad (2)$$

種のモル吸収係数の差を $\Delta \epsilon$ 、ゲスト分子の全濃度を $[\text{G}]_t$ としてセル光路長が 1 cm のとき、

$$\Delta A = K \cdot \Delta \epsilon \cdot [\text{CD}] \cdot [\text{G}]_t / (1 + K \cdot [\text{CD}]) \quad (3)$$

で示される。この式の両辺を逆数にすると次式のようにになる。

$$1/\Delta A = 1/(K \cdot [\text{CD}] \cdot c) + 1/c \quad (4)$$

ここで $c = \Delta \epsilon \cdot [\text{G}]_t$ である。したがって、 $1/[\text{CD}]$ に対して $1/\Delta A$ をプロットすれば、得られる直線の切片と傾きから結合定数 K が求められる。

各種 CD について、PNP をゲストとしたときの 400 nm での吸光度の値から、

(4)式を用いて $1/[CD]$ に対する $1/\Delta A$ を Figure 2 のようにプロットした。これらのプロットは直線に近似（相関係数 0.99% 以上）され、その傾きと切片から結合定数を算出した。他の pH の場合やゲスト分子の CA についても同様なプロットを行い、得られた結合定数を Table 1 にまとめた。

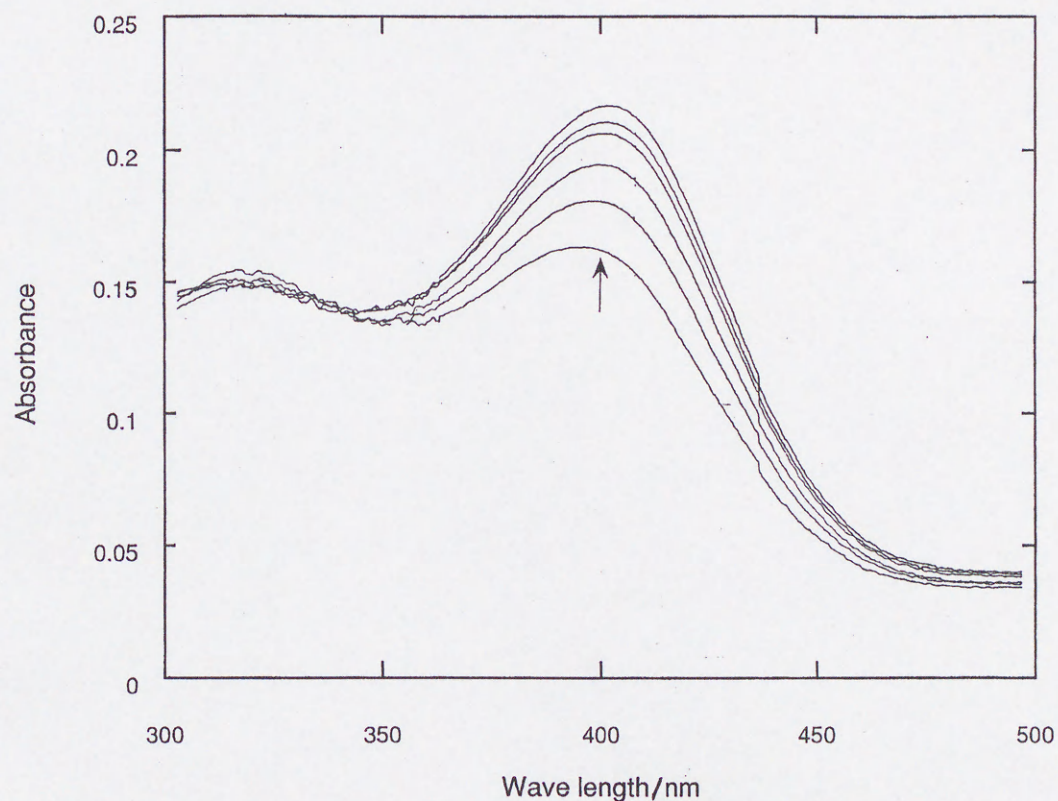


Figure 1. Absorption spectra of PNP at various concentration of CD-NH₂; A trend of the spectral change with the CD concentration is shown by an arrow. [PNP] = 2×10^{-5} mol l⁻¹, pH = 6.9. [CD] = 0, 4×10^{-4} , 8×10^{-4} , 1.2×10^{-3} , 1.6×10^{-3} , and 2.0×10^{-3} mol l⁻¹.

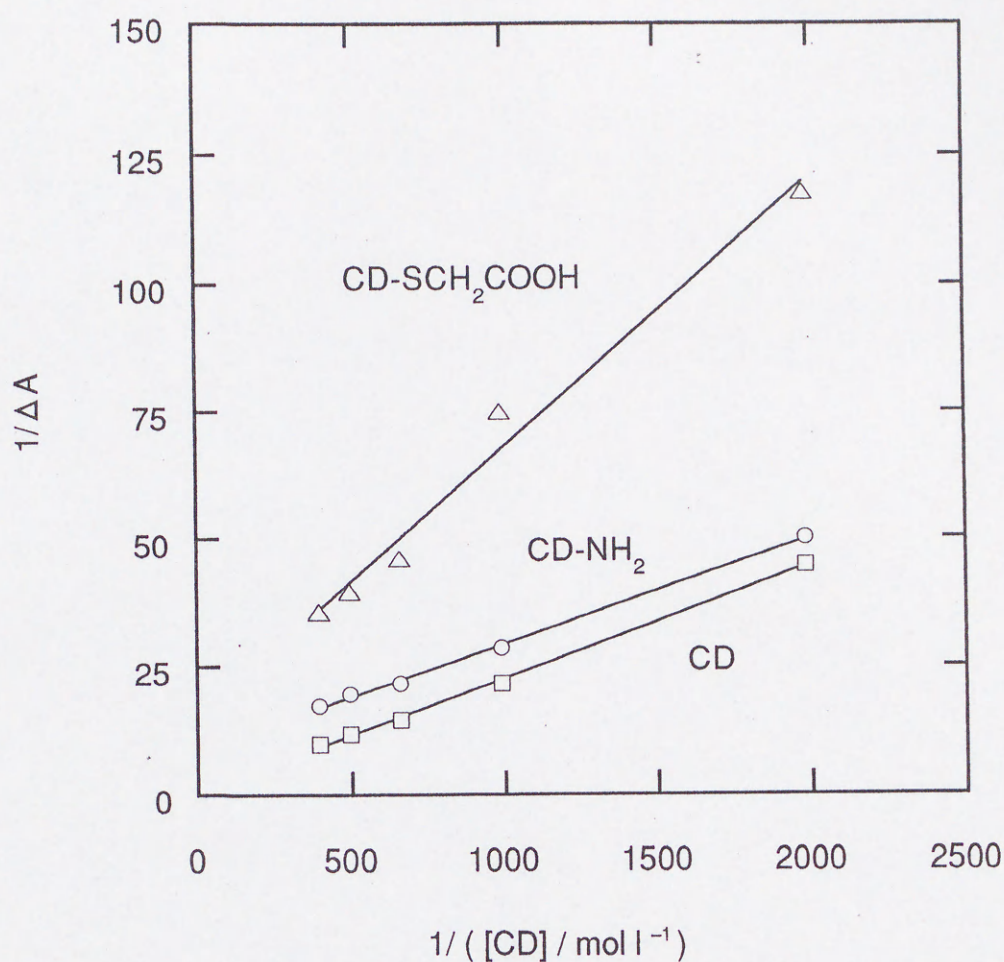


Figure 2. Double reciprocal plots according to eq.(4) for the complexation of PNP with CDs at 25 °C and pH 7.

Table 1 Binding constants of guests with charged cyclodextrins in water at 25 °C^{a)}

Guest	pH	10 ² K / l mol ⁻¹		
		CD	CD-NH ₂	CD-SCH ₂ COOH
<i>p</i> - Nitrophenol	10 (—)	8.4	1.7 (+)	2.0 (—)
	7 (—)	0.22	5.3 (+)	0.36 (—)
	2	0.38	1.5 (+)	0.79
Cinnamic acid	10 (—)	1.7	—	0.44 (—)
	7 (—)	0.42	—	0.29 (—)
	2	4.3	—	4.8

^{a)} Marks in the parentheses denote positively or negatively charged species at the pH.

3-3 考 察

CD の疎水性空洞へのゲスト分子の包接は、電荷を持たない中性ゲスト分子のほうが極性のものよりも有利であることが知られている。しかしながら、PNP についてはフェノールよりもフェノキシアニオンの方がよく取り込まれることが調べられている。⁷ pH 10 での CD について得られた K の値は文献値 ($K = 0.714^{7a}; 0.571^{7b}; 1.00^{7c}; 0.77^{7d} \text{ l mmol}^{-1}$) と比較しても妥当な値であり、酸性および中性 pH での K の値の数十倍になっている。このニトロフェノキシアニオンの CD との高い結合性は、ニトロフェニル基と CD 環との疎水性相互作用の他に、そのアニオン内の電子の非局在化によって生じた CD の誘起双極子との双極子-誘起双極子相互作用やロンドン分散力が働いていることによると考えられている。⁸

一方、CD-NH₂ では pH による結合定数の変化は CD に比べると小さい。それでも pH 7 での K の値は比較的大きく、同じ pH での CD についての値の 24 倍にもなっている。pH 10 では、CD-NH₂ の予想 pKa 値がその pH の値とほぼ同じことから全 CD-NH₂ 分子の約半量がアンモニウムイオン型になっていると考えられ、しかもその量はその pH で全てアニオン化している PNP に比べれば大過剰になっているはずである。そのため、結合定数は pH 7 での値よりも大きくなると予想されるが、逆にその値は小さくなっている。これはおそらく、CD-NH₂ の pKa が予想値の 10 よりも低くなっているためと推察される。CD の二級水酸基は通常のアルコール性水酸基の pKa に比べて 2 から 3 低いことが確かめら

いる。⁹ この pK_a の減少は分子内の水酸基同士の水素結合によるためであることが考えられている。 $CD-NH_2$ のアミノ基は一級水酸基側にあるが、この水酸基や CD と結合している水分子とアミノ基との水素結合が生じ、さらに CD の疎水的雰囲気下にあるために $CD-NH_2$ の pK_a はずっと低くなっていると思われる。そう考えると pH 7 でも $CD-NH_2$ は帯電し、PNP と静電的相互作用によって強く結合できることになる。また pH 10 では $CD-NH_2$ は電荷を持たず PNP とは静電的に相互作用しなくなり、結合は弱くなることを示している。ただしこのとき、アミノ基が CD 環全体の疎水性を緩和するように働き、その結果として PNP との結合が弱くなったとも考えられる。

$CD-SCH_2COOH$ と PNP の結合定数は、 pH 2 と 7 では CD の値とほぼ同じで、電荷の有無による効果はそれほど現れていない。また、 pH 10 での結合定数はアニオン同士の反発によって減少すると予想したが、 $CD-NH_2$ とほぼ同じ値になっている。このことは、 CD の場合と同じように PNP はその酸素アニオンを二級水酸基側にして CD 環内に位置し、 $CD-SCH_2COOH$ のカルボキシレートイオンと相互作用できない状態になっていると推察される。

一方、 $CD-SCH_2COOH$ の CA との結合については PNP の場合とは反対の傾向が見られる。両方の分子がともに電荷を持たない pH 2 では最も結合が強く、両者がイオン性を帯びる pH 7 や 10 では結合が弱くなっている。ただしその K の値は、どの pH についてもほとんど CD と同じであることから、アニオン同士の反発によるものではなく、前に述べた極性置換基による CD 環全体の疎水性の緩

和によると考えられる。

結論として、ここで用いたカチオン性およびアニオン性 CD のイオン性ゲスト分子に対する包接能には、pH を変えても極端な変化は見られず、結合定数でせいぜい数倍程度の変化であった。したがって、CD の包接作用に及ぼす極性の効果は小さいことが確かめられた。しかしながら、カチオン性の CD-NH₂ と PNP の pH 7 での結合定数は、CD についての値より 20 倍以上も大きくなっており、このことは、CD では不利なゲスト分子との結合が、イオン性の CD によって改善されることを示している。

3-4 参考文献

- (1) Y. Matsui, T. Nishioka and T. Fujita, *Top. Curr. Chem.*, 1985, **128**, 61.
- (2) D. D. Perrin, B. Dempsey and E. P. Serjeant, *pKa Prediction of Organic Acids and Bases*, Chapman and Hall, London, 1981.
- (3) K. Takahashi, K. Hattori and F. Toda, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 3331.
- (4) L. D. Melton and K. N. Slessor, *Carbohydr. Res.*, 1971, **18**, 29.
- (5) I. Tabushi, Y. Kuroda and T. Mizutani, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 4514.
- (6) K. A. Connors, *Binding Constants*, Wiley-Interscience, New York, 1987.
- (7) (a) F. Cramer, *Chem. Ber.*, 1951, **84**, 851; (b) K. Takeo and T. Kuge, *Starke*, 1972, **24**, 331; (c) E. A. Lewis and L. D. Hamsen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1973, 2081; (d) Y. Matsui, K. Ogawa, S. Mikami, M. Yoshimoto and K. Mochida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1987, **60**, 1219.
- (8) K. A. Connors, M. J. Lipari, *J. Pharm. Sci.*, 1976, **65**, 379; R. J. Bergeron and R. Rowan, *Bioorg. Chem.*, 1976, **5**, 425; R. J. Bergeron, M. A. Channing, G. J. Gibeily and D. M. Pillor, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 5146; K. A. Connors, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1325.
- (9) R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3253.

第4章 シクロデキストリンに包接された基質の加水分解

酵素の活性中心にある His のイミダゾール基の触媒作用に着目し、第2章では置換イミダゾールを用いてイミダゾールの一般酸-塩基触媒作用における置換基の効果を明らかにした。^{1,2} これは酵素の反応機構に基づいたモデル系であったが、これをさらに酵素に近いモデル系とするために、この章ではシクロデキストリンを基質結合部位とした酵素型反応を行った。

シクロデキストリンの水酸基はセリン酵素における Ser の水酸基と類似した作用によって、シクロデキストリン内に取り込まれた基質を求核攻撃し、その分解反応を促進することはすでに第1章で述べた。シクロデキストリンだけでも結合部位と反応部位を併せ持つ単純な人工酵素になるが、その反応加速性は pH (OH^- 濃度) に比例し、中性領域での活性は低い。^{3,4} 第1章で述べたように、 α -キモトリプシンの活性中心にある His イミダゾール基の一般酸-塩基触媒作用による反応促進は比較的小さいことがわかってきている。それでも、この触媒官能によってどの程度まで反応を加速できるかを調べるために、イミダゾール基を付けたシクロデキストリンを使ってモデル系を構築する試みもいくつかなされている。⁵ しかし、これらの高度な酵素型反応を行う前に、イミダゾール基がシクロデキストリンに共有結合していない反応系についても検討しておく必要がある。

この章では、シクロデキストリンによる触媒的加水分解を受ける酢酸 *m*-ニト

ロフェニルの反応を各種置換イミダゾール緩衝溶液中で行い、シクロデキストリンに取り込まれた基質の分解がその周囲に存在するイミダゾール基によってどの程度加速されるのか、それはどのような機構によるのかを明らかにしようとした。求核触媒反応は置換基による立体効果を受けやすく、置換イミダゾール⁶や置換ピリジン⁷による芳香族エステルの加水分解反応では、置換基によって反応機構が求核から一般塩基触媒作用に変化することが観察されている。本研究で検討するシクロデキストリンに取り込まれた基質と置換イミダゾールとの反応は立体的に混みあってくると考えられ、イミダゾール基による一般塩基触媒作用が現われやすくなると予想された。

4-1 実 験

使用試薬

基質の酢酸 *m*-ニトロフェニルは *m*-ニトロフェノールと塩化アセチルから合成し、ヘキサンで再結晶した (mp 54—55 °C)。使用したイミダゾールは無置換の他に 2-メチル、2-イソプロピル、2-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル) および 2,4,5-トリメチルイミダゾールで、前者の 2 位置換体 3 種は第 2 章で用いたもので、後者のトリメチル体は文献 6 に従って調製した。シクロデキストリン (CD) は第 3 章で用いたものと同じ β 型を使用した。

速度測定

基質エステル S の加水分解反応は、CD を含む各種置換イミダゾール緩衝液 3 ml に 0.020 mol l⁻¹ 基質アセトニトリル溶液を加えて 30°C で行った。緩衝比 ([Im] : [ImH⁺]) はトメチル体については 2.5 : 1 であり、他の置換イミダゾールについては 5 : 1 とした。基質に対して CD が過剰の擬一次条件下 ([S] = 1 × 10⁻⁴, [CD] = 3—10 × 10⁻³, [Im] = 0.1—0.3 mol l⁻¹)、生成するフェノキシアニオンの 400 nm での吸光度を分光光度計 (日立 100-50 型) で追跡し、擬一次速度定数 k_{obs} を算出した。

測定は 2 から 3 回行い、その測定誤差は ±5% 以内であった。さらに、2-イソプロピルおよび 2,4,5-トリメチルイミダゾールについては重水溶媒同位体効果も測定した。

4-2 結 果

無置換およびアルキル置換イミダゾール緩衝液 ($[Im] = 0.10 \text{ mol l}^{-1}$) 中で、CD の濃度を変えたときの k_{obs} の変化は Figure 1 のようになった。図中のプロットのほとんどは飽和型の曲線となり、酵素型の反応を示した。また、2-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)体についても同様なプロットが得られた。しかし、無置換のイミダゾールについては CD 濃度の増加に伴う k_{obs} の減少が観察された。

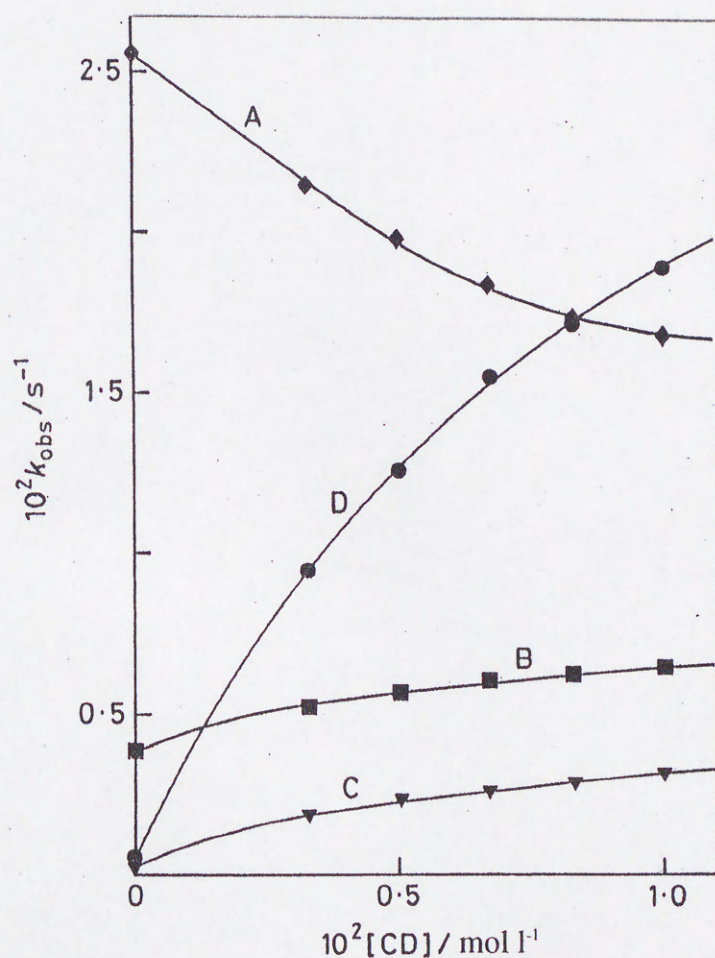
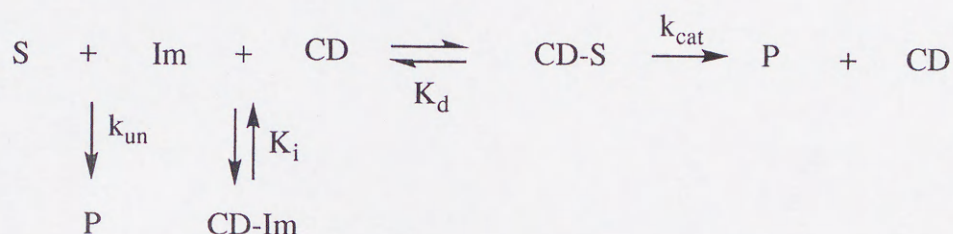


Figure 1. Observed first-order rate constants *versus* β -cyclodextrin concentration in substituted imidazole buffers of 0.10 mol l^{-1} free base concentration: A, imidazole; B, 2-methylimidazole; C, 2-isopropylimidazole; D, 2,4,5-trimethylimidazole. Solid lines are produced by computer using the constants listed in Table 1.

これは、イミダゾール基が CD と複合体を形成し阻害剤としても作用することを意味している。すなわち、反応は Scheme 1 のような経路で進行していると考えられる。基質が CD と複合体 CD-S をつくり (K_d) これが分解する経路 (k_{cat}) と、基質がイミダゾール緩衝液と反応する経路 (k_{un})、それに CD とイミダゾール Im が複合体 CD-Im を形成する経路 (K_i) である。

Scheme 1 による反応初期段階での速度式は次のように誘導される。生成物を与える反応速度は k_{un} と k_{cat} の経路から(1)式で表され、基質についての当量関係から(2)式が成立し、(1)式と(2)式から(3)式が得られる。



Scheme 1

$$\text{速度} = k_{obs}[S]_0 = k_{un}[S] + k_{cat}[CD-S] \quad (1)$$

$$[S]_0 = [S] + [CD-S] \quad (2)$$

$$(k_{obs} - k_{un})[S]_0 = (k_{cat} - k_{un})[CD-S] \quad (3)$$

k_{un} の経路はさらに溶媒化学種による速度定数 k_0 と緩衝液中のイミダゾール塩基による触媒速度定数 k_{Im} を含む(4)式で表される。

$$k_{un} = k_0 + k_{Im}[Im] \quad (4)$$

もしも、CD-S の分解 (k_{cat}) で CD の水酸基の他に共存するイミダゾール塩基が触媒活性を持つならば、 k_{cat} は(5)式のようなになる。

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}] + k_{\text{cat-Im}}[\text{Im}] \quad (5)$$

ここで、 $k_{\text{cat-OH}}$ と $k_{\text{cat-Im}}$ はそれぞれ CD の水酸基と Im による二次触媒速度定数である。CD 水酸基の触媒活性がその解離したアルコキシドイオンによるものであることから、4 (5)式の右辺第1項は溶液の OH^- 濃度、つまり pH に依存することを示している。また、CD と Im についての当量関係は用いた濃度範囲から(6)と(7)式のようになる。

$$[\text{CD}]_0 = [\text{CD}] + [\text{CD-Im}] + [\text{CD-S}] \approx [\text{CD}] + [\text{CD-Im}] \quad (6)$$

$$[\text{Im}]_0 = [\text{Im}] + [\text{CD-Im}] \quad (7)$$

そして、CD-Im および CD-S 複合体の解離定数は次式で定義される。

$$K_i = [\text{CD}][\text{Im}]/[\text{CD-Im}] \quad (8)$$

$$K_d = [\text{CD}][\text{S}]/[\text{CD-S}] \quad (9)$$

(6)と(7)、(8)式から(10)式が、同様に(2)と(9)、(11)式から(12)式が導かれる。

$$[\text{CD-Im}] = \frac{[\text{CD}]_0[\text{Im}]_0 + [\text{CD-Im}]^2}{K_i + [\text{Im}]_0 + [\text{CD}]_0} \approx \frac{[\text{CD}]_0[\text{Im}]_0}{K_i + [\text{Im}]_0} \quad (10)$$

$$\frac{[\text{CD-S}]}{[\text{S}]_0} = \frac{K_i[\text{CD}]_0}{K_d(K_i + [\text{Im}]_0) + K_i[\text{CD}]_0} \quad (11)$$

さらに、(3)と(10)から Lineweaver-Burk 型の(12)式が得られる。ここで見かけの解離定数 K_{app} を(13)式のように定義した。

$$\frac{1}{k_{\text{obs}} - k_{\text{un}}} = \frac{K_d(K_i + [\text{Im}]_0)}{[\text{CD}]_0 K_i (k_{\text{cat}} - k_{\text{un}})} + \frac{1}{k_{\text{cat}} - k_{\text{un}}} \quad (12)$$

$$K_{\text{app}} = \frac{K_d(K_i + [\text{Im}]_0)}{K_i} = K_d + \frac{K_d[\text{Im}]_0}{K_i} \quad (13)$$

(12)式の $1/[\text{CD}]$ に対する $1/(k_{\text{cat}} - k_{\text{un}})$ の両逆数プロットを Figure 2 に示す。

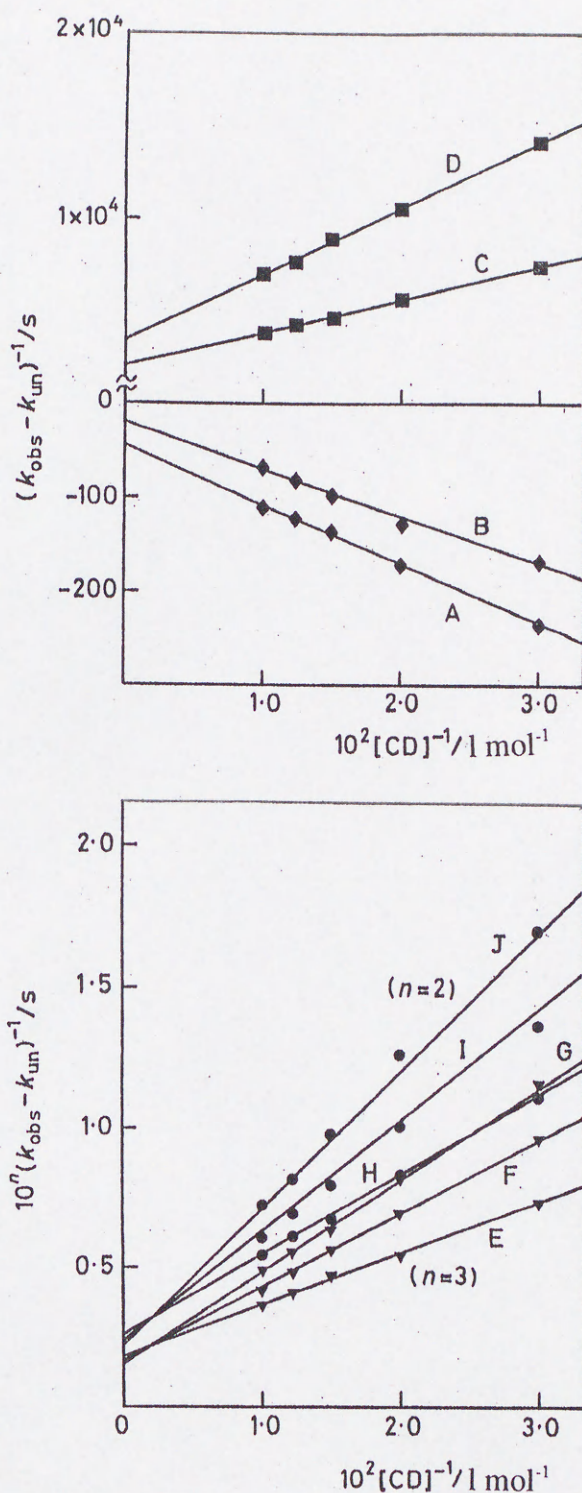


Figure 2. Lineweaver-Burk-type plots for different buffer free base concentrations to give k_{cat} and K_{app} values: for imidazole, A 0.10 mol l⁻¹, B 0.20 mol l⁻¹; for 2-methylimidazole, C 0.10 mol l⁻¹, D 0.20 mol l⁻¹; for 2-isopropylimidazole, E 0.10 mol l⁻¹, F 0.20 mol l⁻¹, G 0.30 mol l⁻¹; for 2,4,5-trimethylimidazole, H 0.10 mol l⁻¹, I 0.20 mol l⁻¹, J 0.30 mol l⁻¹. Solid lines are drawn by computer using the constants listed in Table 1 and 2.

これらのプロットから得られる直線の切片と傾きを使って k_{cat} と K_{app} を求めた。さらに k_{un} と k_{cat} 、 K_{app} のイミダゾール緩衝液濃度による変化から(4)、(5)および(13)式を用いて k_0 、 k_{Im} 、 $k_{\text{cat-OH}}$ 、 $k_{\text{cat-Im}}$ 、 K_d および K_i の各速度パラメーターを求め、これらの値を Table 1 と Table 2 にまとめた。

Table 1 Various constants for the hydrolysis of *m*-nitrophenyl acetate by β -cyclodextrin in substituted imidazole buffers

	Imidazole substituent	pKa ^{a)}	$10^3 k_0 /$ s^{-1}	$10^3 k_{\text{Im}} /$ $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$10^3 [\text{OH}]$ $k_{\text{cat-OH}} / \text{s}^{-1}$	$10^3 k_{\text{cat-Im}} /$ $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
1	2-H	7.19	2.4	233	0.75	2.5
2	2-Me	8.10	0.22	36.6	7.4	16.0
3	2-Pr ⁱ (H ₂ O)	8.01	0.16	2.8	5.1	8.4
4	2-Pr ⁱ (D ₂ O)		0.14	2.1	3.7	4.6
5	2-HOCH ₂ C(Me) ₂	7.54	0.55	0.066	2.1	4.3
6	2,4,5-Me ₃ (H ₂ O)	9.03	0.45	0.75	35.3	35.5
7	2,4,5-Me ₃ (D ₂ O)		0.27	0.89	16.0	16.0

^{a)} Ref. 6.

Table 2 Dissociation and inhibition constants for the hydrolysis of *m*-nitrophenyl acetate by β -cyclodextrin in substituted imidazole buffers

	Imidazole substituent	$10^3 K_d /$ mol l^{-1}	$K_i /$ mol l^{-1}
1	2-H	9.4	0.15
2	2-Me	7.3	0.51
3	2-Pr ⁱ (H ₂ O)	4.1	0.081
4	2-Pr ⁱ (D ₂ O)	5.2	0.20
5	2-HOCH ₂ C(Me) ₂	6.8	0.058
6	2,4,5-Me ₃ (H ₂ O)	5.5	0.14
7	2,4,5-Me ₃ (D ₂ O)	4.7	0.17

4-3 考 察

CD はいろいろな物質と複合体を形成することを第 1 章で説明した。ここで用いた置換イミダゾール類も CD と結合すると考えられ、場合によっては Figure 1 の無置換イミダゾール (曲線 A) のように阻害効果も現われてくる。Figure 2 のプロットが直線に近似できることや、Table 1 と 2 の各速度パラメーターを(12)式に代入して得られる k_{obs} の計算値が実測値によく一致することから、Scheme 1 に示した反応経路と速度式の解析方法は妥当である。

置換イミダゾール緩衝液についての(4)式は芳香族エステルの加水分解におけるイミダゾールの求核触媒作用^{6, 8}に対応したものになっている。Table 1 の k_0 の値は測定した pH 範囲が狭いためにばらついているが、 k_{Im} の値は置換基が小さくなると著しく減少し、明らかにこれらの置換イミダゾールが求核触媒として作用していることが確認される。

(5)式中の $k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}]$ はその時の溶液の pH における CD 水酸基の触媒速度定数を表し、その log 値を pH に対してプロットすれば傾き 1 の直線が得られるはずである。このことは Figure 3 のプロットから確かめられ、同じ基質について Bender らが求めている pH 10.6 での CD の触媒速度定数 (0.444 s^{-1})³ もこの直線上にある。したがって、今回求めた $k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}]$ の値をこれと同じ pH10.6 に換算した値もこの文献値³ とほぼ一致することから、この $k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}]$ についての経路は基質から CD 水酸基へのアシル基移動であることが明らかである。

Table 2 中の全ての置換イミダゾールについて、CD-S 複合体の解離定数 K_d の

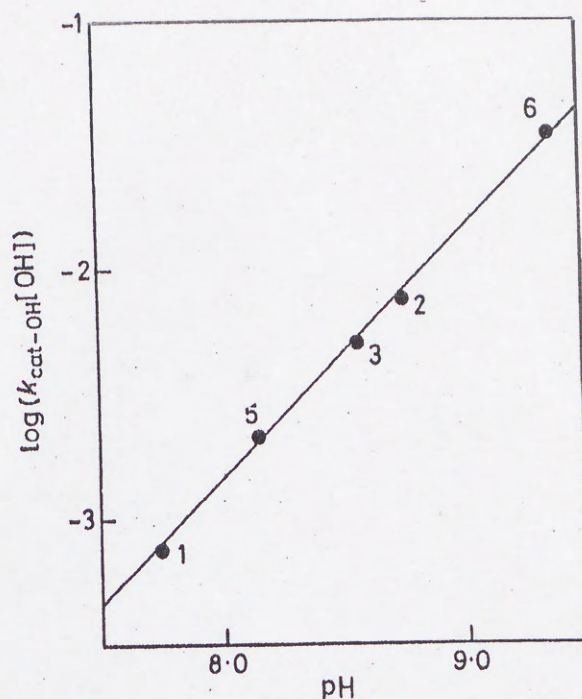
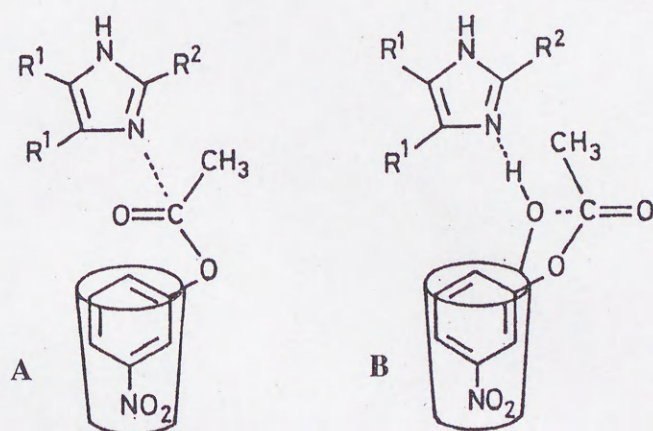


Figure 3. Plot of $\log(k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}])$ versus pH of the solution. A straight line with slope of 1.0 is provided: numbers refer to the imidazoles given in Table 1.

値も文献値 ($8.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$)³ とほとんど同じである。各置換イミダゾールの K_i はその K_d よりも約 10 倍から数 10 倍大きく、基質に比べてイミダゾールと CD の結合は弱いものである。にもかかわらずイミダゾールは緩衝剤として高濃度で存在しているため、CD-S 複合体の生成を妨げることになる。このように置換イミダゾールは k_{un} と k_{cat} の経路では触媒として、CD-S の生成では阻害剤として作用している。

イミダゾール濃度の増加による k_{cat} の増大から(5)式によって $k_{\text{cat-Im}}$ が得られたことは、明らかに CD-S 複合体の触媒的分解にイミダゾール基が関与していることを示している。このときのイミダゾール基の作用には、CD 内の基質を直接

的に攻撃する求核触媒作用 (Scheme 2A) と CD の水酸基を介したイミダゾールの一般塩基触媒作用 (Scheme 2B) が考えられる。他に、CD の水酸基ではなく水分子を介したイミダゾールの一般塩基触媒作用も予想されるが、この機構はほとんど作用していないであろう。もしもイミダゾール基の作用が水分子を介したものであれば、(5)式にはイミダゾール濃度を 0 にしたとき、 $k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}]$ の他に pH に依存しない水分子による速度項があらわれるはずである。先に述べたように、文献値とほぼ一致する $k_{\text{cat-OH}}[\text{OH}]$ が計算されたことは、そのような水分子による速度項がないことを示している。Scheme 2B の機構は酵素の活性部位で見られる His イミダゾール基の作用と類似したものである。Figure 1 の曲線 A のような CD 濃度の増加に伴う k_{obs} の減少は、基質へのイミダゾール基の求核攻撃が CD による基質の包接によって妨げられていることになる。この阻害作用から、無置換のイミダゾールは Scheme 2A の機構で作用しているのかも知れない。しかしながら、このことは Scheme 2B の機構を否定するものではなく、こ



Scheme 2

これらの機構が同時に起こっていることも考えられる。

Table 1 の k_{Im} はイミダゾール基による求核触媒作用を反映して、置換基のかさ高さに大きく依存している。しかし、 $k_{\text{cat-Im}}$ は置換基のかさ高さよりもむしろ pK_a に依存しているようであり、各置換イミダゾール間の $k_{\text{cat-Im}}$ の値の差は k_{Im} についての差よりもずっと小さい。例えば、かさ高い置換基を持つ 2,4,5-トリメチル体や 2-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)体では $k_{\text{cat-Im}}/k_{\text{Im}}$ が 50 から 70 倍にもなっている。これは、イミダゾールの一般塩基触媒作用を表わす Scheme 2B の機構が $k_{\text{cat-Im}}$ の経路で優先的に起こっていることを意味している。このことを確かめるために、各置換イミダゾールの pK_a に対して $\log(k_{\text{cat-Im}})$ をプロットした Brönsted プロット (Figure 4) を行った。このプロットから得られた直線の傾き β は 0.62 となり、この値も一般塩基触媒作用を支持する証拠である。⁹ さらに、

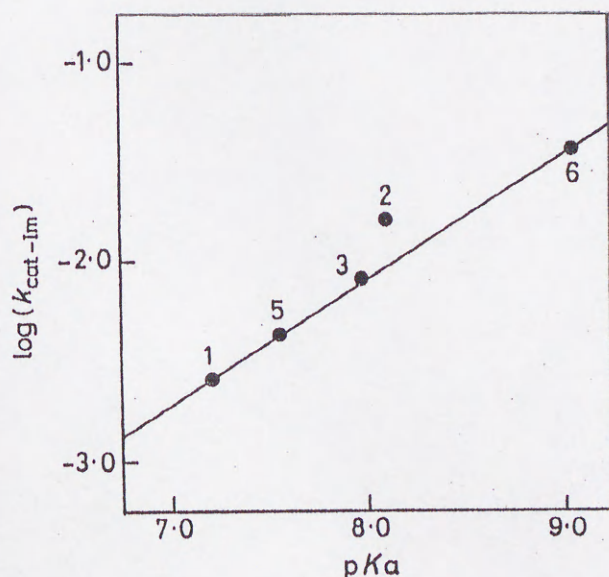


Figure 4. Brönsted plot of $\log(k_{\text{cat-Im}})$ values versus pK_a of the imidazoles. The slope is estimated to be 0.62; numbers refer to the imidazoles given in Table 1.

イソプロピル体とトリメチル体について行った $k_{\text{cat-lm}}$ の重水溶媒同位体効果 (Table 1) の値が約 2 であることから Scheme 2B の機構が裏付けられる。

CD による芳香族エステルの加水分解でイミダゾール誘導体を添加した同様の反応系が調べられており、イミダゾール基は CD 内の基質に対して求核触媒として作用することが報告されている。¹⁰ この報告では測定条件や速度の解析方法も異なるので、今回の結果とは一概に比較することはできない。また CD を用いない系ではあるが、水酸基を介するイミダゾール基の一般塩基触媒作用が 2、2-ジメチルプロピオン酸 2-ヒドロキシ-4-ニトロフェニルの分子内アシル基移動反応で見出されている。¹¹ この反応では、反応点近傍の立体障害のためにイミダゾールの求核攻撃が抑えられ、かわりにイミダゾールの一般塩基触媒作用によって促進された基質分子内の水酸基の攻撃が観察されている。本実験でのアシル基移動に関与する水酸基は CD 上であって、分子内ではなく分子間で基質と反応するものであるが、今回の場合の反応もこれに類似した作用によると考えられる。すなわち、基質が CD に取り込まれることによってその反応点がイミダゾール基の直接攻撃から防御され、さらにイミダゾール上の置換基がその立体効果によってイミダゾール自身の求核作用を抑えた結果、Scheme 2B のような反応点近傍にある CD 水酸基へのアシル基移動を促進するイミダゾール基の一般塩基触媒作用が現われてきたと推察される。

以上のように、置換イミダゾール緩衝液中、CD を結合部位とした基質エステルの加水分解を行うことで酵素型反応を構築した。この反応系はまた、イミダ

ゾールが触媒と阻害剤の両方の作用を持つ珍しい系でもあった。さらにこの反応では、CD に取り込まれた基質の分解が、酵素中に見られるような周囲に存在するイミダゾール基の一般塩基触媒作用によって促進されることを明らかにした。このようにして、酵素活性部位にある触媒官能基が結合部位としての CD と共有結合せずに共存した系によっても酵素型の反応を行うことができた。しかしながら、その反応加速性は低いものだった。

4-4 参考文献

- (1) M. Akiyama, M. Ihjima and Y. Hara, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1979, 1512.
- (2) M. Ihjima, M. Fukuyama, T. Kobayashi, T. Hirakawa and M. Akiyama, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1987, 669.
- (3) R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3242.
- (4) R. Breslow, M. F. Czarniecki, J. Emert and H. Hamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 762; G. L. Trainor and R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 154.
- (5) F. Cramer and W. Dietsche, *Chem. Ber.*, 1959, **92**, 1739; Y. Iwakura, K. Uno, F. Toda, S. Onozuka, K. Hattori and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 4432; Y. Kitaura and M. L. Bender, *Bioorg. Chem.*, 1975, **4**, 237; A. Ueno, F. Moriwaki, T. Osa, T. Ikeda, F. Toda and K. Hattori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1986, **59**, 3109; H. Ikeda, R. Kojin, C.-J. Yoon, T. Ikeda and F. Toda, *Chem. Lett.*, 1987, 1495; V. T. D'Souza and M. L. Bender, *Acc. Chem. Res.*, 1987, **20**, 146; H. Ikeda, R. Kojin, C.-J. Yoon, T. Ikeda and F. Toda, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 311; H. Ikeda, R. Kojin, C.-J. Yoon, T. Ikeda and F. Toda, *J. Inclusion Phenomena*, 1989, **7**, 117; H. Ikeda, R. Kojin, Y.-Q. Du, T. Ikeda and F. Toda, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 5045.
- (6) M. Akiyama, Y. Hara and M. Tanabe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1978, 288.
- (7) A. R. Butler and I. H. Robertson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1975, 660.
- (8) M. L. Bender and B. W. Turnquest, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 1652.
- (9) W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969.
- (10) M. Komiyama, E. J. Breaux and M. L. Bender, *Bioorg. Chem.*, 1977, **6**, 127.
- (11) D. W. Griffiths and M. L. Bender, *Bioorg. Chem.*, 1975, **4**, 84.

第5章 修飾シクロデキストリンによる酵素型反応

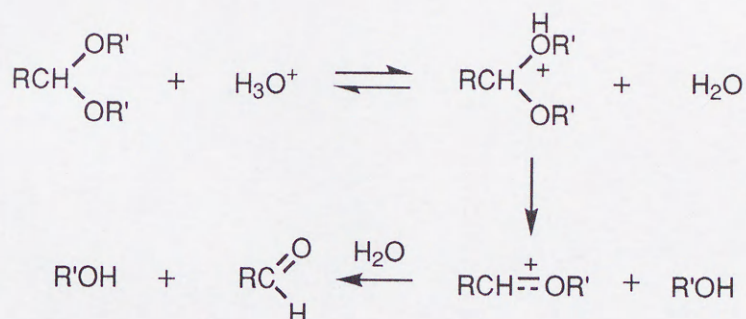
前章で検討したように、結合部位に触媒官能基が共有結合していなくとも反応機構的には酵素型の反応を再現することができた。しかしその場合には、シクロデキストリン水酸基とイミダゾール窒素との反応は、分子間反応になるためにイミダゾール基の有効濃度¹は低く、その反応系による速度の加速性は低かった。

これまでも多くのシクロデキストリンを用いた加水分解酵素モデルが研究されている。しかし、それらのほとんどは基質に対して触媒過剰の条件下で行われている。その理由は、第1章で述べたようにエステル加水分解におけるシクロデキストリンの触媒作用が、アシル化された安定なシクロデキストリン中間体の生成を伴う共有結合的なものだからである。² 天然酵素と同じように基質過剰の条件で反応させた場合には、この中間体が反応系内に蓄積されてしまい、そのためにシクロデキストリンは再生されず、ターンオーバー性が低くなってしまう。シクロデキストリンを真の酵素モデルとするには、このような中間体を速やかに分解できる触媒官能基をシクロデキストリンに導入することが不可欠である。それによって高効率、高選択性の酵素型反応を達成することができるであろう。そこで本章では、シクロデキストリンに取り込まれた基質に触媒官能基が効率良く作用できるように、ヒスタミンとグリシンを β -シクロデキストリンの一級水酸基の一つと置換した、2種類の修飾シクロデキストリンを合成し、それらの触媒反応挙動を調べた。

ヒスタミンはイミダゾール基を含むため、ヒスタミン修飾シクロデキストリン (CD-histamine) はタンパク質加水分解酵素 α -キモトリプシンの良い酵素モデルとなることが期待される。その反応挙動を観察するために酢酸 *p*-ニトロフェニル (PNPA) を基質として、触媒に対し基質濃度過剰の条件下で加水分解を行い、ターンオーバー性や中性領域での触媒活性について検討した。

グリシンを修飾したシクロデキストリン (CD-gly) は、そのカルボキシル基がシクロデキストリンに取り込まれた基質に対して酸触媒作用を示すと予想される。そこで、これを加水分解酵素リゾチームのモデルとして、酸性領域での触媒活性を観察することにした。リゾチームは多糖類からなる細胞壁の直鎖グルコピラノース間のグルコシド結合を切断する酵素で、その活性中心では Glu のカルボキシル基が一般酸触媒として作用し、生じるカルボニウム中間体を近接する Asp のカルボキシレートイオンが安定化させていると考えられている。³ CD-gly の触媒能を調べるために、第 2 章の置換イミダゾールの一般酸触媒作用の研究で用いたジエチルフェニルオルトホルメート (DEPOF) ⁴ と、カルボン酸類の一般酸触媒による加水分解反応が確認されている 2-(*p*-ニトロフェノキシ) テトラヒドロピラン (PNPTHP) ⁵ を基質として使用した。アセタールやケタール、オルトエステルは Scheme 1 に示すように H_3O^+ の特殊酸触媒作用によって加水分解し、一般酸触媒作用は観察されないことが知られている。これらの反応では、迅速なプロトン化平衡のあとの安定化されたカルボニウムイオン中間体への分解が律速段階となっている。⁶ ここで用いる DEPOF や PNPTHP の加水

分解で一般酸触媒作用が現れたのは、つまり初めのプロトン移動が律速になったのは、アルコール部分を脱離しやすいフェノール類に変えてC-O結合を開裂しやすくし、さらに溶媒を極性の低いジオキサン水溶液にしてカルボカチオン中間体ができやすいようにしたためである。シクロデキストリン内部やその近傍は、周りの水媒体中よりも極性は低い状態にある。このことから、純水中であってもシクロデキストリンの疎水性空洞に取り込まれた基質の加水分解では、その近くにあるシクロデキストリンに共有結合したグリシン残基による一般酸触媒作用が現われやすくなると予想される。



Scheme 1

シクロデキストリンもまた、酸に不安定なグルコシド結合からできているために、酸性領域でのシクロデキストリンの触媒作用に関する研究は極めて少ない。⁷ しかしながら、今後のシクロデキストリンの広範な利用のためには、酸性領域での触媒活性の検討にも興味を持たれる。

5-1 実 験

使用試薬

PNPA (mp 78—79 °C) は市販品をヘキサンから再結晶して用いた。基質の DEPOF は第 2 章で用いたものであり、PNP-THP は文献 4a にしたがってジヒドロピランと *p*-ニトロフェノールから合成した。シクロデキストリン (CD) は第 3 章で用いたものを使用した。

次の各修飾 CD の合成や物性測定で用いた装置は第 3 章で使用したものと同じである。

6-deoxy-6-iodo- β -cyclodextrin (CD-I)

第 3 章で合成したトシル体 CD-OTs (20g, 15.5 mmol) の無水 MeOH 溶液 200 ml に NaI (13.6 g, 91 mmol) を加え、60 °C で 3 時間攪拌した。反応溶液をアセトン 1000 ml 中に攪拌しながら注ぎ、白色沈殿を得た。これをろ別して減圧乾燥した後、ポリスチレンゲルカラム (日本練水 HP-20, 30% aq. MeOH) に通して精製し、標題化合物 (6.75 g, 35%) を得た。得られた CD-I の物理定数は文献値⁸と一致した。

TLC R_f = 0.45, HPLC R_t = 13.5 min (ODS-80TM, 10% aq. CH₃CN 0.75 ml min⁻¹)

6-deoxy-6-histaminyl- β -cyclodextrin (CD-histamine)

無水 DMF 400 ml に CD-I (10 g, 7.3 mmol) とヒスタミン (9.1 g, 83 mmol) を加え、100 °C で 24 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮した後、残渣を少量の水に溶かし、ポリスチレンゲルカラム (日本練水 HP-20, 20% aq. MeOH) および

シリカゲルカラム (ワコーゲル C-100, 5% aq. Na_2CO_3) に付した。溶出液をさらにポリスチレンゲルカラム (20% aq. MeOH) に通して精製し、溶出液を減圧濃縮、乾固させ標題化合物 (0.98 g, 10%) を得た。

TLC R_f : 0.14; HPLC R_t : 14.1 min (ODS-80TM, 15% aq. CH_3CN 0.75 ml min⁻¹).

Found: C, 45.13; H, 6.20; N, 3.26%, Calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{77}\text{O}_3\text{N}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 45.26; H, 6.34; N, 3.37%.

¹³C-NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 26.4($\text{CH}_2\text{-Im}$), 49.2(C-6'), 60.0(C-6), 70.2(C-5'), 72.1(C-5), 72.4(C-2), 73.0(C-3), 81.7(C-4), 83.4(C-4'), 102.0(C-1), 134.6(Im)

6-deoxy-6-glycyl- β -cyclodextrin (CD-gly)

CD-OTs (10 g, 7.8 mmol) とグリシン Na 塩 (3.7 g, 38 mmol) を 1000 ml の無水 MeOH 中で 3 日間還流した。析出した白色沈殿をろ過し、水 60 ml に溶かした。この水溶液を 1 mol l⁻¹ の塩酸で pH 5 から 6 に調整し、一晩放置した。沈殿した未反応物をろ別し、ろ液を 500 ml のアセトンに攪拌しながら注ぎ、析出した白色結晶をろ過し、減圧乾燥後、分取高速液体クロマトグラフィー (R_t 26.4 min, ODS-80TM, 1.5% aq. CH_3CN 15 ml min⁻¹) で精製した (2.4g, 26%)。pH 滴定⁹ から求められた官能基の pKa 値は 2.3 (CO_2H) と 8.9 (NH_2^+) だった。

TLC R_f : 0.14, HPLC R_t : 12.2 min (ODS-80TM, 1% aq. CH_3CN 0.8 ml min⁻¹).

Found: C, 43.18; H, 6.33; N, 1.10%, Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{73}\text{NO}_{36} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 43.03; H, 6.32; N, 1.14%.

IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹: 3380, 2960, 1740, 1635, 1156, 1122, 1080, 1030.

^{13}C -NMR (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 47.2(C-6'), 49.6(glycine CH_2), 59.8(C-6), 68.7(C-5'), 71.9(C-5), 72.3(C-3), 73.1(C-2), 82.0(C-4), 83.1(C-4'), 100.8(C-1'), 101.7(C-1), 169.3(glycine $\text{C}=\text{O}$).

速度測定

PNPA の加水分解反応 (CD-histamine)

25 $^{\circ}\text{C}$ で $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ の CD-histamine を含む pH 6.8 のリン酸緩衝液 (0.067 mol l^{-1}) 中に基質 PNPA のアセトニトリル溶液を加え、その初濃度を $0.1\text{--}2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ として反応を開始した。生成するフェノキシアニオンの 400 nm での吸光度 (日立 220-A 型分光光度計) の時間変化から初速度 V_0 を求めた。さらに pH を変えた実験も同様に行った。また、比較のために未修飾の CD についても測定した。

DEPOF および PNPTHP の加水分解反応 (CD-gly)

CD-gly 水溶液に 1 mol l^{-1} 塩酸水溶液を加えて部分的に中和し、触媒を兼ねた緩衝液 ($[\text{buffer}]_{\text{total}} = 0.1\text{--}2.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$) とし、DEPOF の加水分解では緩衝比 ($[\text{CD-gly}] : [\text{CD-glyH}^+]$) を 7 : 1 (pH 3.36) に、PNPTHP の加水分解では 1 : 1 (pH 2.48) にした。これに基質のアセトニトリル溶液を加え、基質初濃度を $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ として一定温度 (20 $^{\circ}\text{C}$ および 40 $^{\circ}\text{C}$) で反応させ、生成するフェノールの 272.2 nm または 330 nm での吸光度変化 (日立 100-50 型分光光度計) から擬一次速度定数 k_{obs} を算出した。同様に、Gly 単独についてもこれを緩衝液として測定した。さらに、一定濃度の Gly 緩衝液中にいろいろな濃度の未修飾 CD を加えた場合についても行った。さらに、DEPOF については触媒緩衝液の緩

衝比を 9:1 (pH 3.48) にしても反応を行った。

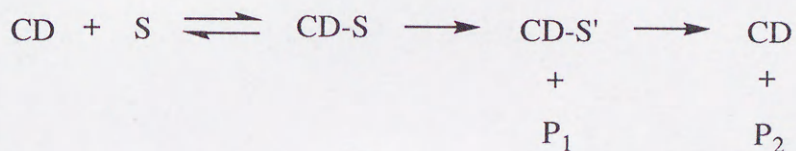
上記の測定は 2 回以上行い、 k_{obs} の測定誤差は $\pm 5\%$ 以下であった。

5-2 結 果

PNPA の加水分解反応 (CD-histamine)

触媒となる CD-histamine のターンオーバー性を確かめるために、PNPA の濃度を CD-histamine よりも過剰にしてその加水分解反応を行った。生成したフェノールの時間変化を Figure 1 に示す。5 時間反応後では、CD-histamine はその初濃度の 4 倍近くのフェノールを生成している。ところが、未修飾の CD ではその初濃度の 1/4 程度しか PNPA は反応していない。Figure 2 は基質濃度を変えて得られたフェノール生成の初速度 V_0 の PNPA 初濃度に対するプロットである。未修飾の CD ではその濃度増加によってほとんど反応は加速されないが、CD-histamine では非常に大きな加速性が見られる。ヒスタミン単独およびヒスタミンと CD の混合系でも反応加速性は観察されるが、それは CD-histamine に比べれば低いことがわかる。

Figure 2 中の CD-histamine についてのプロットが飽和曲線を描くことから、この反応は Scheme 2 のように進行すると考えられ、 V_0 は Michaelis-Menten 型の(1)式で表される。この機構では、基質エステルとの反応によって CD-S 複合体がアシル化 CD 中間体 CD-S' とアルコール P_1 に分解し、次に CD-S' が加水分解してカルボン酸 P_2 と元の CD を生成する。ここで $[CD]_0$ と $[S]_0$ は、触媒として用いた



Scheme 2

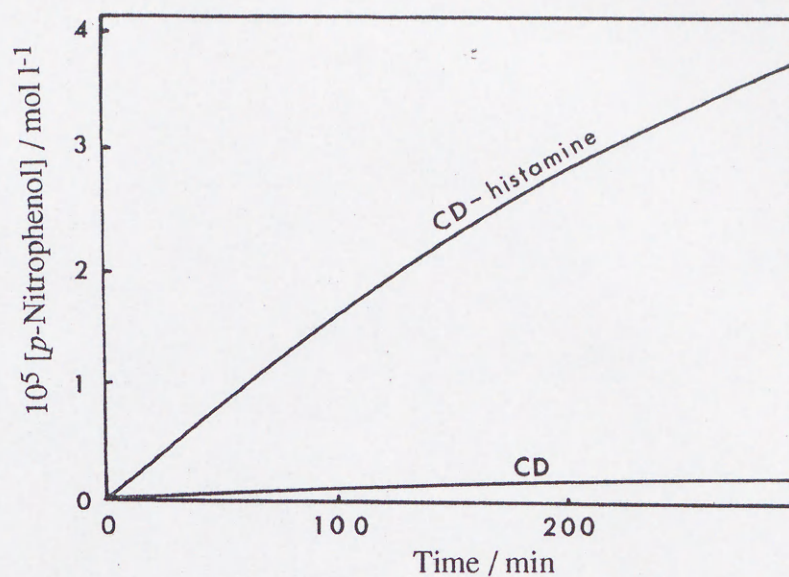


Figure 1. Variation of *p*-nitrophenol concentration with time in the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. $[CD]_0 = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $[S]_0 = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$.

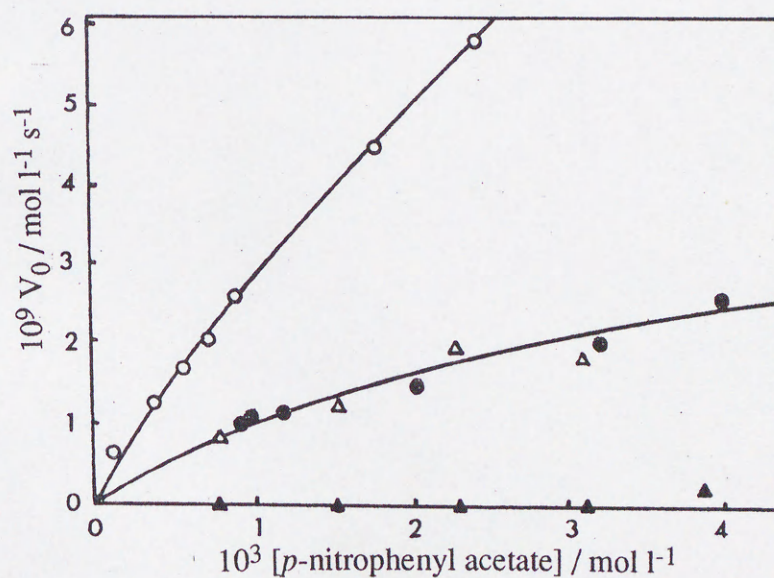


Figure 2. Variation of rates of hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate in the presence of various catalysts. CD-histamine (○), histamine (△), CD (▲), CD + histamine (1:1 mixture) (●), $[CD]_0 = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}[\text{CD}]_0[\text{S}]_0}{K_m + [\text{S}]_0} \quad (1)$$

CD-histamine 濃度と PNPA 初濃度である。そして k_{cat} は CD-histamine の触媒速度定数、 K_m は CD-S 複合体の解離定数と見なせる Michaelis 定数である。(1)式から誘導される Lineweaver-Burk プロット (Figure 3) は良好な直線関係を示し、得られた直線の切片と傾きから k_{cat} と K_m の値を求めた (Table 1)。

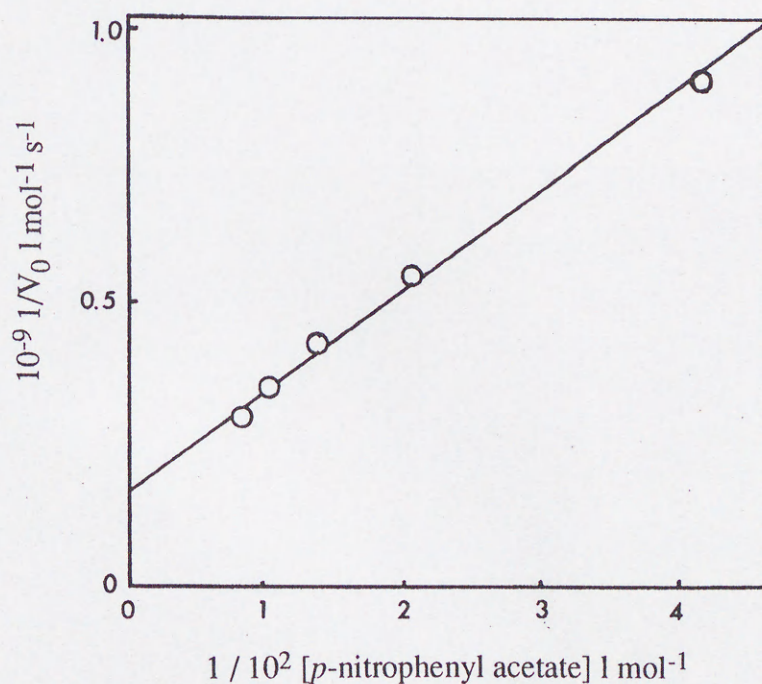


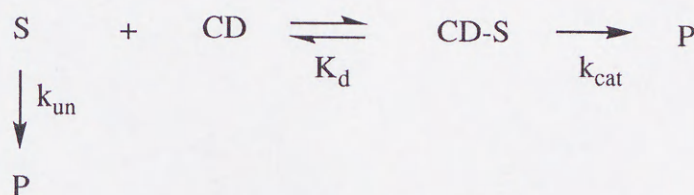
Figure 3. Lineweaver-Burk plot of hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate with CD-histamine.

Table 1 Catalytic rate constants in the hydrolysis of *p*- nitrophenyl acetate

Catalyst	$10^2 k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$10^3 K_{\text{m}} / \text{mol l}^{-1}$	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{m}}} / \text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
CD-histamine	0.82	4.4	0.19
CD	~ 0	—	—
α -Chymotrypsin	6.5	7.7	0.85

DEPOF および PNPTHP の加水分解反応 (CD-gly)

pH 一定の Gly や CD-gly 緩衝液の濃度および Gly 緩衝液中の CD 濃度を変えて得られた k_{obs} の変化を Figure 4 と 5 にプロットした。これらの図から、どちらの基質についても Gly は反応に関与せず、緩衝剤としてのみ作用していることがわかる。一方、CD と CD-gly ではその濃度増加に伴って k_{obs} はしだいに減少し、一定値に近づいているようである。このことは CD 空洞に基質が結合し、阻害反応が起こっていることを示している。しかしながら、第 4 章で述べたように CD 環に取り込まれた基質の分解過程もあるとして、両者の基質の加水分解経路を Scheme 3 のように考えた。もしも CD が阻害作用のみを有するのであれば、



Scheme 3

CD-S 複合体が生成物に分解する経路についての触媒速度定数 k_{cat} の値は 0 になるはずである。このとき、複合体の解離定数 K_d は阻害定数に置き換えられることになる。Scheme 3 から、 k_{obs} は CD 濃度の関数として(2)式で与えられる。²

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{un}}K_d + k_{\text{cat}}[\text{CD}]_0}{K_d + [\text{CD}]_0} \quad (2)$$

そして、 k_{obs} の実測値から(2)式を使った非線形最小二乗法によって k_{cat} と K_d の値を計算した。

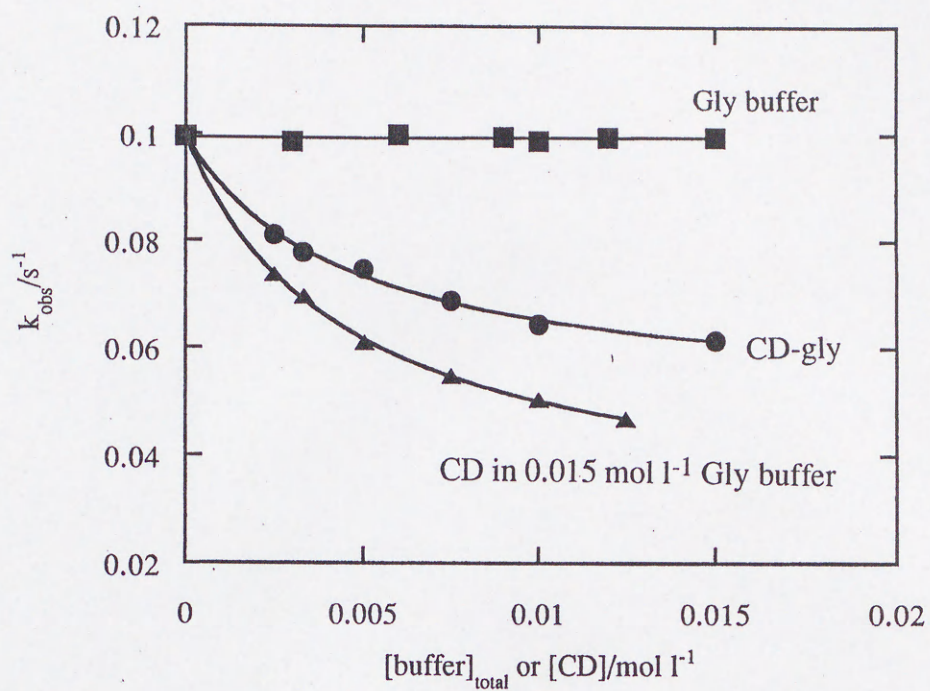


Figure 4. Dependence of rate constants on the concentration of CD and CD-gly for the hydrolysis of DEPOF at 20 °C, pH 3.36, and ionic strength 0.01 (KCl).

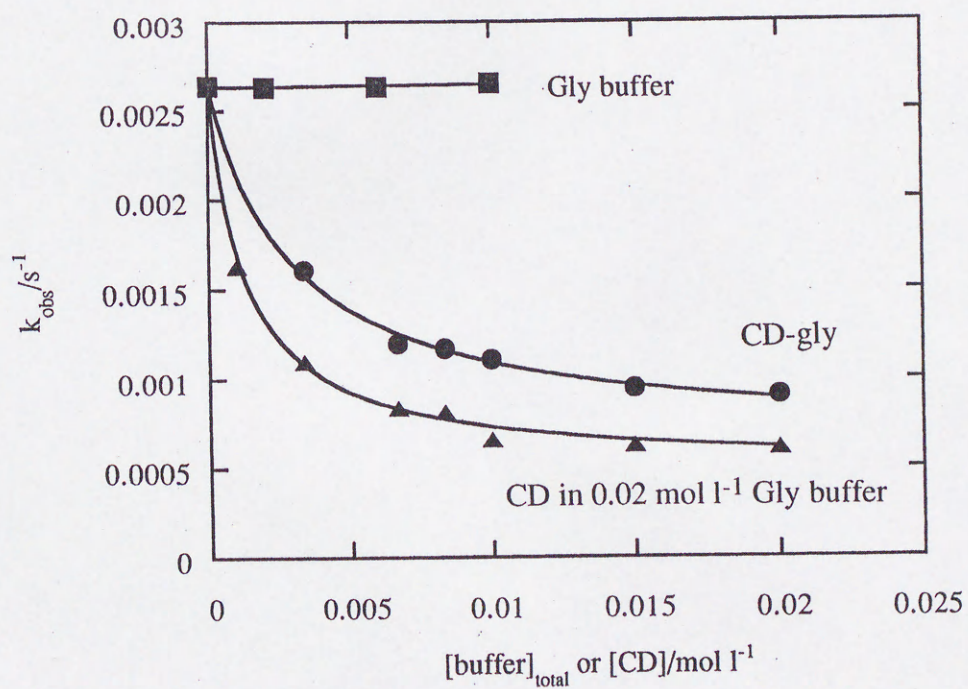


Figure 5. Dependence of rate constants on the concentration of CD and CD-gly for the hydrolysis of PNPThP at 40 °C, pH 2.48, and ionic strength 0.01 (KCl).

Table 2 には各基質について得られたこれらの値を載せた。Figure 4 および 5 の実線は Table 2 の k_{cat} と K_d の値を(2)式に代入して描かれたものであり、相関係数 99.8% 以上で実測値に良く適合している。

Table 2 Kinetic parameters for the hydrolysis of DEPOF and PNPTP in the presence of CD catalysts

Substrate	Catalyst	$10^2 k_{\text{un}} / \text{s}^{-1}$	$10^2 k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / k_{\text{un}}$	$10^3 K_d / \text{mol l}^{-1}$	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_d} / \text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
DEPOF ^{a)}	CD ^{b)}	9.95	3.09	0.31	2.78	11
(293 K, pH 3.36)	CD-gly		4.98	0.50	4.51	11
DEPOF ^{a)}	CD ^{b)}	8.79	1.26	0.14	6.36	2.0
(293 K, pH 3.48)	CD-gly		2.37	0.27	9.92	2.4
PNPHTP ^{c)}	CD ^{d)}	2.63	0.0488	0.0056	1.28	3.8
(313 K, pH 2.48)	CD-gly		0.0633	0.0072	2.98	2.1

^{a)} At 20 °C and ionic strength 0.1 (KCl). ^{b)} In 0.015 mol l⁻¹ Gly buffer. ^{c)} At 40 °C.

^{d)} In 0.02 mol l⁻¹ Gly buffer.

5-3 考 察

5-3-1 ヒスタミン修飾シクロデキストリンの触媒活性

触媒に対して基質過剰の条件では、結合部位しか持たない未修飾の CD の反応活性は低いことが Figure 1 と 2 から確認された。これは先に述べたように、PNPA の加水分解に対する CD の触媒作用が、その水酸基による共有結合的なものであり、途中で生成したアシル CD 中間体の分解が律速段階となり、CD が再生されないからである。しかしながら、CD-histamine の場合には Figure 1 で示したように約 60 分反応後にはフェノールの濃度は用いた CD-histamine 濃度を上回り、CD-histamine はターンオーバー性を持つことが観察された。また、Figure 3 の Lineweaver-Burk プロットは良い直線性を示していることから、Scheme 2 のように CD-histamine への基質の取り込みによって反応が起こっていることは明らかである。

Table 1 に示したように、未修飾の CD の k_{cat} の値がほとんど 0 であることから、CD-histamine の反応加速性は、予想したように CD 上に共有結合したヒスタミン残基によってもたらされていることは確かである。CD-histamine の k_{cat} の値は同じ条件で得られた α -キモトリプシンについての値の 1/8 であり、PNPA の反応に対する触媒の有効性を表す k_{cat} / K_m の値は α -キモトリプシンの約 1/4 にもなっている。PNPA は α -キモトリプシンにとって適切な基質ではないが、この値から CD-histamine は天然酵素に迫る触媒活性を持っていると言える。

Figure 6 は、pH を変えて得られた k_{cat} の log 値が pH に依存していることを表

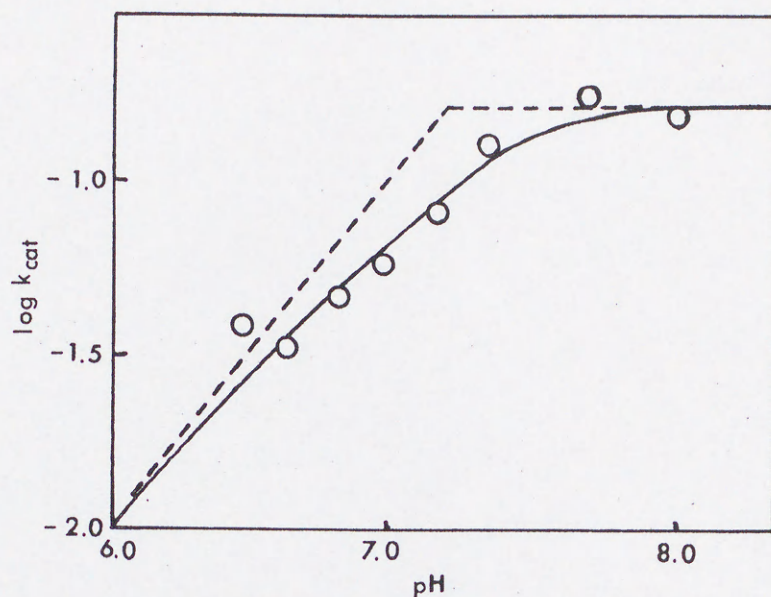
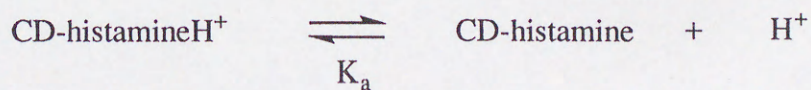


Figure 6. Dependence of k_{cat} on pH in the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate with CD-histamine.

わしている。このプロットでは、pH の増大とともに k_{cat} の log 値も増加し、その後は一定になっている。このことは CD-histamine の触媒活性が中性領域で最大になることを意味しており、この修飾 CD が優れた酵素類似機能を持っていることを示すものである。Figure 6 のプロットに近似させた傾き 1 の破線は、pH 約 7 付近で屈曲している。CD-histamine はそのイミダゾール基がプロトン化した CD-histamineH⁺と Scheme 4 のような平衡にあると考えられる。



Scheme 4

ここで、CD-histamineH⁺の見かけの解離定数 K_a は(3)式で定義される。

$$K_a = \frac{[\text{CD - histamine}][\text{H}^+]}{[\text{CD - histamineH}^+]} \quad (3)$$

基質はこれら両方の CD に取り込まれると考えられるが、プロトン化したものではなく遊離の CD-histamine と結合した基質の方が生成物を与えるとすると、その k_{cat} は遊離の CD-histamine の濃度に比例し、(4)式のようになる。ここで、 k_{his} は二次触媒速度定数である。また、その濃度は(3)式から CD-histamine の全濃度 $[\text{CD-histamine}]_t$ と溶液の H⁺濃度で決まり、(5)式で表わされる。この式を(4)式に代入すると(6)式が得られる。

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{his}} [\text{CD-histamine}] \quad (4)$$

$$\begin{aligned} [\text{CD-histamine}] &= K_a ([\text{CD-histamine}]_t - [\text{CD-histamine}]) / [\text{H}^+] \\ &= [\text{CD-histamine}]_t / (1 + [\text{H}^+] / K_a) \end{aligned} \quad (5)$$

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{his}} [\text{CD-histamine}]_t / \{ 1 + [\text{H}^+] / K_a \} \quad (6)$$

この式で $[\text{CD-histamine}]_t$ が一定のもとでは、 K_a の値よりも H⁺濃度の高いところ、つまり pH の低い領域では (7)式のように $\log (k_{\text{cat}})$ は pH に勾配 1 で比例し、 K_a の値よりも pH の高い領域では(8)式のように pH には無関係で一定になってくる。

$[\text{H}^+] \gg K_a$:

$$\log (k_{\text{cat}}) \approx -\log (k_{\text{his}} [\text{CD-histamine}]_t K_a / [\text{H}^+]) = \text{constant} + \text{pH} \quad (7)$$

$[\text{H}^+] \ll K_a$:

$$\log (k_{\text{cat}}) \approx -\log (k_{\text{his}} [\text{CD-histamine}]_t) = \text{constant} \quad (8)$$

したがって、pH に対して $\log(k_{\text{cat}})$ をプロットすれば、 pK_a に相当する pH のところに屈曲部分が現れてくることになる。¹⁰ Figure 6 に見られるこの屈曲点における pH の値は、ヒスタミン残基中のイミダゾール基の pK_a 値に近く、¹¹ CD-histamine の触媒活性が CD に共有結合したイミダゾール基によるものであることを示唆している。このイミダゾール基の触媒作用には、第 4 章で述べたように求核的なものや一般塩基触媒作用などいくつか考えられるが、ここではその触媒反応機構までは検討しなかった。

α -キモトリプシンをモデルとしてヒスタミンを修飾した CD-histamine は、PNPA の加水分解反応においてターンオーバー性と中性付近での最大触媒活性を示し、天然酵素に近い反応活性を持っていた。このように、結合部位に取り込まれた基質に有効に触媒官能基を作用させるには、共有結合によって官能基を反応点に近接させることが重要な因子の一つであると考えられる。

5-3-2 グリシン修飾シクロデキストリンの触媒活性

Gly 単独では DEPOF と PNP-THP の両方の基質の加水分解 (Figure 4 と 5) において触媒作用を示さない。これらの基質の加水分解が一般酸触媒作用を受けるのは 50% ジオキサン水溶液中であり、4, 5 極性の高い純水中では H_3O^+ による特殊酸触媒作用が支配的となる。したがって、この場合も同様に Gly 緩衝液中の基質の加水分解は H_3O^+ によるものであると考えられる。この H_3O^+ による特殊酸触媒作用は、Table 2 に示した DEPOF についての k_{un} の値が pH の増加で減少することからも明らかである。

Figure 4 と 5 に示した触媒濃度による k_{obs} の変化曲線は CD と CD-gly で似ている。CD-gly は緩衝剤としても作用しているが、これらの反応挙動も類似していると考えられる。CD と CD-gly はどちらの基質についても反応を阻害しているが、(2)式を使った非線形最小二乗法によって得られた k_{cat} の値 (Table 2) はどちらの場合についても 0 にはならなかった。このことは、Scheme 3 で考えた CD に取り込まれた基質の分解が起こっていることを示している。しかしながら、 k_{un} よりも k_{cat} が小さいために、これらの CD は反応を阻害しているように見えるのである。そして、このような減速効果 ($k_{\text{cat}}/k_{\text{un}}$) はどちらの基質についても未修飾の CD の方が CD-gly よりも大きくなっている。しかし、基質との結合はわずかに CD の方が CD-gly より強い。その結果として、基質選択性 (k_{cat}/K_d) は CD と CD-gly でほとんど同じ程度になっている。このような CD と CD-gly の類似性は両方の基質について見られ、CD に共有結合させた Gly 残基による効果

はほとんど現れていない。

CD-S 複合体から生成物が生じる反応 (k_{cat}) は、基質反応点の近傍に位置する CD の水酸基と、周囲に存在する H_3O^+ によるものが考えられる。しかし、CD 水酸基²と H_3O^+ の酸解離定数 ($\text{pK}_{\text{a}}(\text{CD-OH}) = 12-14$, $\text{pK}_{\text{a}}(\text{H}_3\text{O}^+) = -1.74$) や反応溶液の pH におけるこれらの存在濃度を考え合わせると、 H_3O^+ による反応が優先的であろう。この H_3O^+ による作用は、Table 2 の DEPOF についての k_{cat} の値が k_{un} と同じく pH 依存性を示していることから推察される。

最近、Tee らはベンズアルデヒドジメチルアセタールの加水分解における α -, β -, γ -CD とヒドロキシプロピル修飾 β -CD の遅延 (阻害) 効果を報告している。^{7d} この報告では、CD の遅延効果は基質結合構造における反応点の不利な位置と、カチオン性中間体である遷移状態と CD との不利な結合から説明されている。本研究もこれと似た反応系であり、観察された遅延効果は基質中の反応点が CD によって外界 (H_3O^+ からのプロトン移動) から隔離されているためと考えられる。また、生成する中間体もカチオン性であることから、反応の遷移状態と CD との不利な結合も存在するかも知れない。PNP-THP の加水分解における各種リン酸修飾 CD による遅延と加速効果は Breslow らによってすでに調べられており、^{7a} 未修飾の CD による遅延効果は、基質が取り込まれた空洞内の疎水性環境がプロトン移動を妨げていることから説明されている。この説明もまた、前述の Tee らの反応点の位置に関するものと同じことを意味している。

CD-gly と未修飾の CD は類似した反応挙動を示し、Gly 残基の特別な効果は観

察されなかった。CD の一級水酸基側に置換した Gly 残基が反応にほとんど影響を及ぼさないことから、CD 内に結合した基質はそのフェニル基のパラ位を一級水酸基側にし、反応点を二級水酸基側にした配向をとっていると推定される。CD よりも CD-gly の k_{cat} がわずかに大きくなったのは、CD にイオン性の Gly 残基が付いたことによって分子全体の疎水性が緩和され、外界からの H_3O^+ の反応を受けやすくなったためと考えられる。

リゾチームをモデルとして、アセタールやオルトエステルの加水分解における CD-gly の一般酸触媒作用を期待したが、予想した加速効果は得られなかった。この反応では CD-gly はむしろ阻害剤として作用し、反応を遅延した。この遅延効果は、基質が CD の疎水性空洞内へ取り込みまれたことによって、 H_3O^+ から疎水性環境下にある基質反応点へのプロトン移動が妨げられたことによると考えられる。このように、単に触媒官能基を結合部位に共有結合させただけでは触媒作用が発現しないこともある。CD を用いたより効果的な酵素型反応を行うには、CD 内での基質の配向性や空間配置、そして遷移状態における構造などを考慮してモデル系を設計する必要がある。

5-4 参考文献

- (1) A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1980, **17**, 183; A. J. Kirby, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 290.
- (2) R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3253.
- (3) A. R. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman, New York, 1984; C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman, San Francisco, 1979; T. H. Fife, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1975, **11**, 81.
- (4) E. Anderson and T. F. Fife, *J. Org. Chem.*, 1972, **37**, 1993.
- (5) (a) T. H. Fife and L. K. Jao, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 4081; (b) T. H. Fife and L. H. Brod, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 1681.
- (6) T. H. Fife, *Acc. Chem. Res.*, 1972, **5**, 264; E. H. Cordes and H. G. Bull, *Chem. Rev.*, 1974, **74**, 581.
- (7) (a) B. Siegel, A. Pinter and R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 2309; (b) O. S. Tee and J. M. Bennett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 269; (c) O. S. Tee and B. C. Javed, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1994, 23; (d) O. S. Tee, A. A. Fedortchenko and P. L. Soo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1998, 123.
- (8) L. D. Melton and K. N. Slessor, *Carbohydr. Res.*, 1971, **18**, 29.
- (9) A. Albert and E. P. Serjeant, *The Determination of Ionization Constants*, Chapman and Hall, London, 1971.
- (10) T. C. Bruice and S. J. Benkovic, *Bioorganic Mechanisms*, vol. I, Benjamin, New York, 1966.
- (11) D. D. Perrin, B. Dempsey and E. D. Serjeant, *pK_a Prediction for Organic Acids and Bases*, Chapman and Hall, London, 1981.

第6章 グリシン修飾シクロデキストリン—金属錯体の反応挙動

高度な酵素型反応を構築するには、触媒官能基をシクロデキストリンに共有結合させることが重要であり、それと同時に、生成物を与える生産的な複合体の形成や、遷移状態の安定化を念頭において酵素モデルを設計しなければならないことは前章で述べた。事実、天然酵素は基質とはむしろ緩く結合し、生成物に至る遷移状態の構造に適合するよう仕組まれている。¹

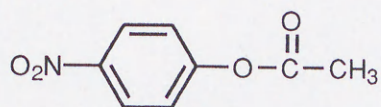
シクロデキストリンの高機能化のひとつに、その2量体化がある。疎水性の結合部位を2個持つことで、基質疎水部分との相互作用が強まり、これらの協同効果からシクロデキストリン2量体は非常に高い基質結合性や選択性を発現する。2個のシクロデキストリン単体を結合させるには次の2つの方法がある。すなわち、(1) 継ぎ手やスペーサーとなる分子を挟んでシクロデキストリンを共有結合させる方法と、(2) 配位子を付けたシクロデキストリンを金属イオンに配位させる方法である。

(1)の共有結合によってできるシクロデキストリン2量体はこれまで数多く研究され、抗原—抗体結合に近い結合性や酵素に匹敵する反応加速性が見出されている。² しかしながら、(2)の金属イオンとの配位結合によって形成されるシクロデキストリン2量体についての研究は現在までのところほんの数例しかない。³ この配位結合によってできる2量体は比較的容易に調製でき、共有結合によるものと同じく協同的に作用できる2つの疎水性場と、官能基としての配

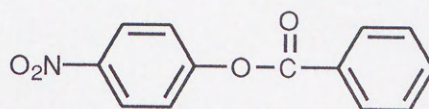
位子と金属イオンを有している。そのため、このシクロデキストリン 2 量体は金属酵素のモデルになりうるものである。さらに、2つのシクロデキストリン環の配位によって生じる特別な空間的配置が、酵素の反応加速性の原因として説明されているような遷移状態の安定化に寄与し、新たな基質選択性や反応加速性を引き起こすことが予想される。

本章では、第 5 章で合成した CD-gly が銅イオンに配位し 2 量体 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ を形成することから、このシクロデキストリン 2 量体の触媒反応挙動を観察した。基質には安息香酸部分とニトロフェニル部分の 2 つの疎水性部をもつ安息香酸の *m*-および *p*-ニトロフェニルエステル (MNPB と PNPB) を用いて、この“長い基質”の加水分解が $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ によってどの程度加速されるのか、そして *m* 体と *p* 体についての基質選択性を持つのかどうかを明らかにしようとした。

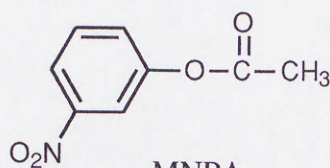
また、いくつかの光学活性な N-Boc 保護アミノ酸の *p*-ニトロフェニルエステルの加水分解における $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の基質選択性や、立体選択性についても検討した。さらに、アシル部分の炭素数の異なる長鎖アルキルカルボン酸の *p*-ニトロフェニルエステルを基質として、基質疎水部分の長さが $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の触媒作用に及ぼす影響を調べた。ここで用いた基質の構造を Scheme 1 に示す。



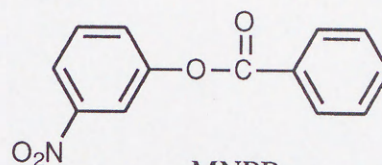
PNPA



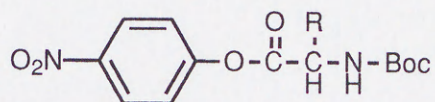
PNPB



MNPA

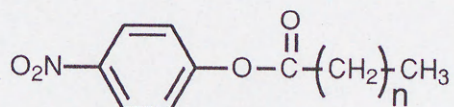


MNPB



N-Boc amino acid *p*-nitrophenyl ester

N-Boc-Gly PNP, N-Boc-L-Ala PNP,
N-Boc-D-Phe PNP, N-Boc-L-Phe PNP,
N-Boc-L-Asn PNP, N-Boc-L-Gln PNP,



p-Nitrophenyl alkanoate

acetate (n=0), butylate (n=2),
caproate (n=4), caprylate (n=6),
caprate (n=8)

Scheme 1

6-1 実 験

使用試薬

PNPB および MNPB は対応するニトロフェノールと塩化ベンゾイルの反応から合成した (MNPB: mp 93—94 °C; PNPB: mp 140—141 °C)。各種 N-Boc 保護アミノ酸および長鎖アルキルカルボン酸 *p*-ニトロフェニルエステルは Sigma 社製の市販品をそのまま使用した。他の試薬類はこれまでの章で用いたものである。

CD-gly と銅イオンとの錯体形成

$1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ CD-gly の pH 9.3 炭酸緩衝液 (0.1 mol l^{-1}) と、これに $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ の CuCl_2 を加えた溶液の円偏光二色性スペクトル (日本分光 J-700 型) を測定した。

CD-gly と Cu^{2+} との錯体形成を観察しその結合比を求めるために、Matsui らの方法⁴に従って $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ CD-gly の pH 9.3 炭酸緩衝液 (0.1 mol l^{-1}) 2 ml に $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ の CuCl_2 水溶液を 0.01 ml ずつ加えていき、そのときの 650 nm での吸光度 (島津 UV-210 分光光度計) を測定した。

さらに、pH 滴定法⁵によってこの錯体の結合比と結合定数を詳細に求めるために、25 °C、一定イオン強度で $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ CD-gly と $3.99 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ の CuCl_2 を含む溶液を $1.4 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ NaOH 水溶液で滴定した。そして NaOH の滴下量とそのときの pH (ORION SA-720 pH 計) を記録した。

速度測定

PNPA、MNPA、PNPB、MNPB および長鎖アルキルカルボン酸のエステルの加水分解は、基質濃度を $0.01\text{--}1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ として 25°C 、pH 10.6 (0.05 mol l^{-1} 炭酸緩衝液) で行った。 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ は溶液中で CD-gly と CuCl_2 を混合し、2 : 1 のモル比とすることで調製した。触媒となる $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の濃度を $0.25\text{--}2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ として、反応で生成するフェノキシアニオンの吸光度変化 (日立 100-50 分光光度計) から前章と同じく擬一時速度定数 k_{obs} を求めた。比較のために、CD、CD-gly、Gly およびその銅錯体である $(\text{Gly})_2\text{Cu}$ についても同様に行った。

なお、アミノ酸エステルの加水分解反応は CD-gly、および CD-gly の濃度を $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ に、 $(\text{Gly})_2\text{Cu}$ および $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の濃度を $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ にして 25°C の pH 9.4 炭酸緩衝液 (0.02 mol l^{-1}) 中で行った。

ベンゾイルシクロデキストリン中間体の検出

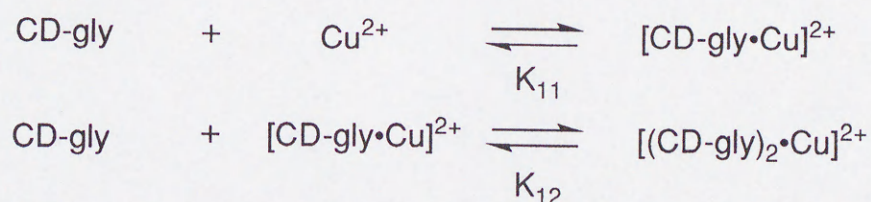
$(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ による PNPA および MNPB の加水分解反応で生成すると考えられる、ベンゾイルシクロデキストリン中間体の生成と分解を観察するために、Bender らの方法⁶ に準じて基質濃度を $2\text{--}3 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ 、 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ 濃度を $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ として反応させ、240 nm (PNPB) および 245 nm (MNPB) での吸光度変化を追跡した。同様に、CD ($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$) と CD-gly ($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$) についても測定した。

6-2 結 果

CD-gly と銅イオンとの錯体形成

CD-gly 単独では Figure 1 のように円偏光二色性を示さないが、これに Cu^{2+} を加えると大きな正の Cotton 効果が現れた。Figure 2 は、CD-gly 水溶液に Cu^{2+} を加えていったときの吸光度変化を、そのときの CD-gly と Cu^{2+} の濃度比に対してプロットしたものである。このプロットには $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{CD-gly}] = 1/2$ のところに屈折が認められ、生成する金属錯体は CD-gly と Cu^{2+} が 2:1 の錯体 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ であることがわかった。

この金属錯体を生成するときの逐次生成定数 K_{11} と K_{12} は Scheme 2 で表わされる。 Cu^{2+} を含む CD-gly 水溶液の NaOH による滴定値とそのときの pH の値から、これらの生成定数を計算した。⁵ その結果、 $\log K_{11} = 6.28$ 、 $\log K_{12} = 5.11$ であった。



Scheme 2

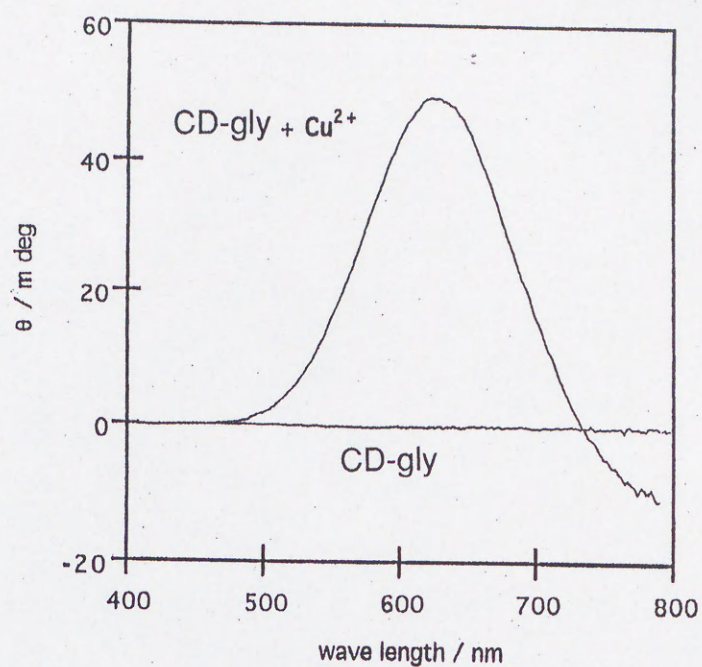


Figure 1. Circular dichroism spectra of CD-gly and its Cu^{2+} complex in pH 9.3 carbonate buffer. $[\text{CD-gly}] = 1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

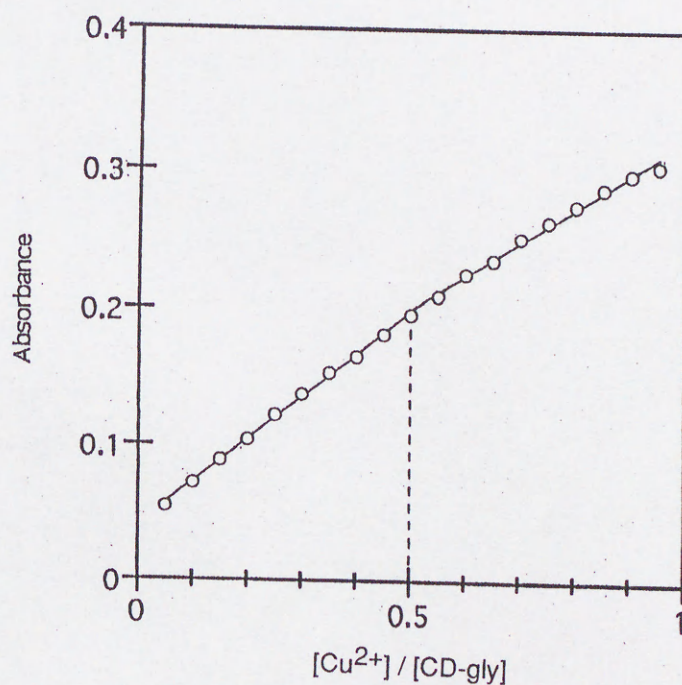
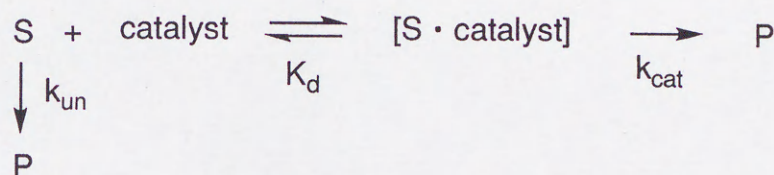


Figure 2. Plots of absorbance at 650 nm *versus* $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{CD-gly}]$ at 25°C in pH 9.3 carbonate buffer. $[\text{CD-gly}] = 1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

m-および*p*-置換フェニルエステルの加水分解

それぞれの基質加水分解について、触媒としての各 CD 誘導体および Gly とその銅錯体(Gly)₂Cu の濃度を変えて得られた k_{obs} の値を Figure 3 から 6 にプロットした。(CD-gly)₂Cu の速度加速は特に Figure 4 の PNPB について大きく現れている。また、Gly や (Gly)₂Cu はどの基質でもほとんど加速効果を示していない。Figure 3 から 6 の各 CD 触媒についてのプロットは飽和曲線を描いていることがわかる。したがって、前章と同様に反応は Scheme 3 で表わされ、 k_{obs} は(1)式で与えられる。ここで k_{un} は溶媒緩衝液による速度定数、 K_d は基質-触媒の複合体の解離定数、 k_{cat} は複合体の生成物への触媒分解速度定数である。結合部位を持



Scheme 3

たない Gly と(Gly)₂Cu については、それらの二次速度定数 k_2 を使って k_{obs} は(2)式のように表わされる。

$$k_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat}} - k_{\text{un}})[\text{catalyst}]}{[\text{catalyst}] + K_d} + k_{\text{un}} \quad (1)$$

$$k_{\text{obs}} = k_2[\text{catalyst}] + k_{\text{un}} \quad (2)$$

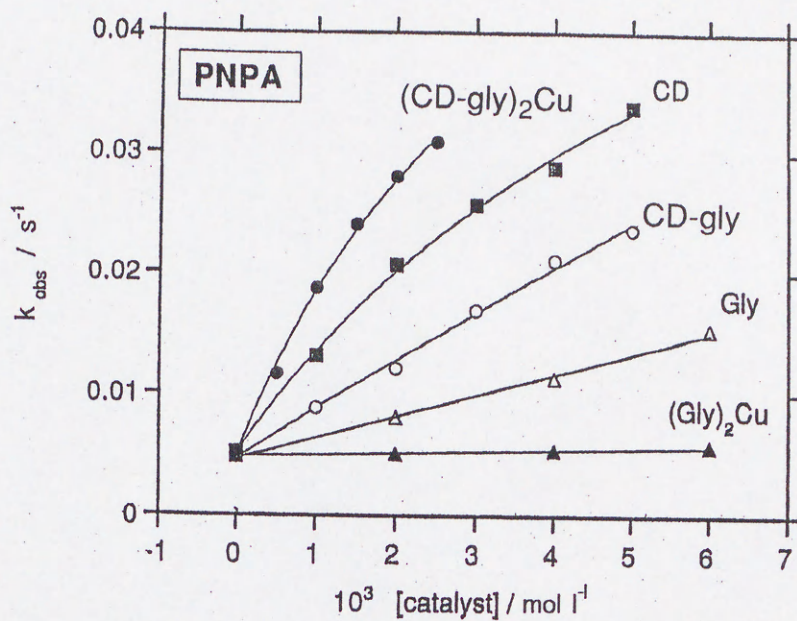


Figure 3. Plots of k_{obs} versus concentration of CD for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate.

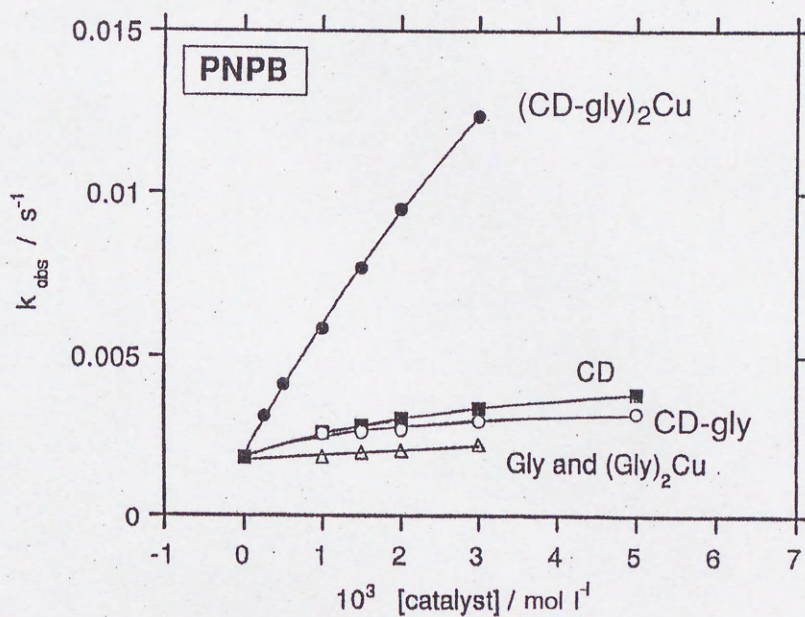


Figure 4. Plots of k_{obs} versus concentration of CD for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl benzoate.

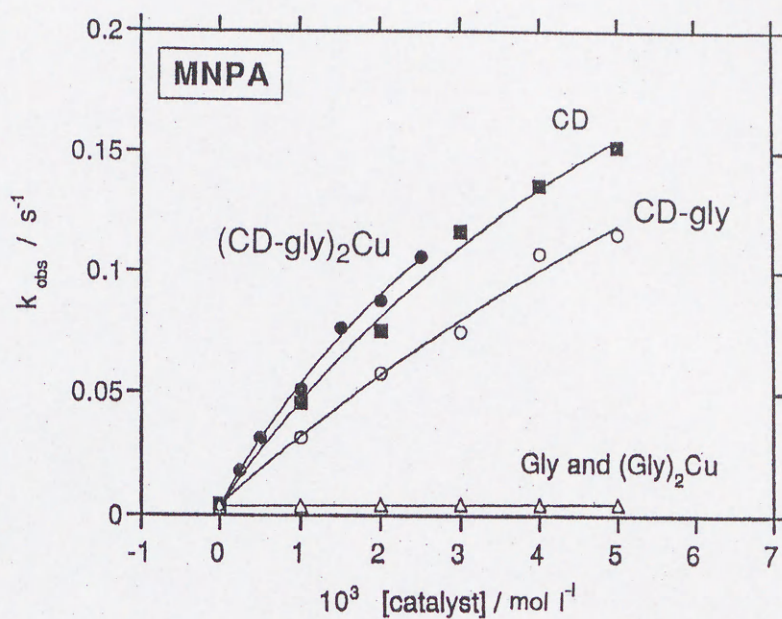


Figure 5. Plots of k_{obs} versus concentration of CD for the hydrolysis of *m*-nitrophenyl acetate.

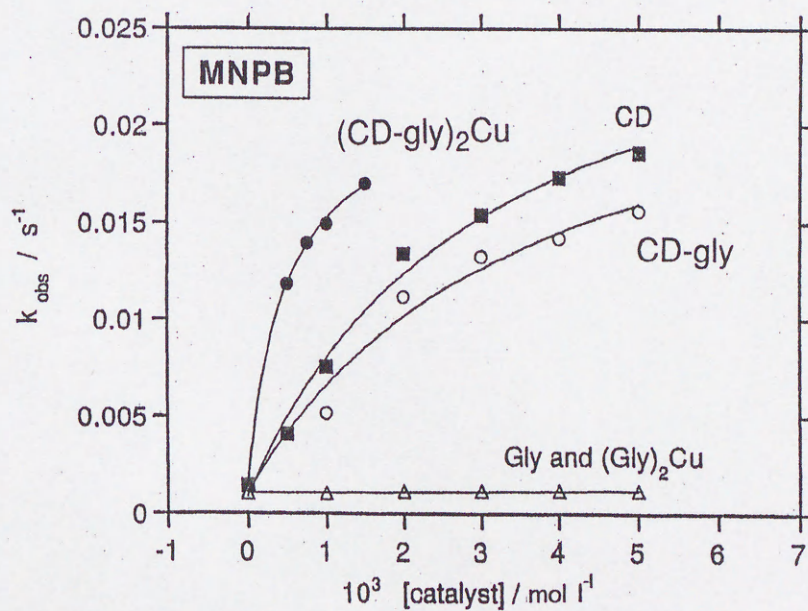


Figure 6. Plots of k_{obs} versus concentration of CD for the hydrolysis of *m*-nitrophenyl benzoate.

Figure 3 から 6 の k_{obs} の値から非線形最小二乗法によって(1)式の速度パラメーターを計算した。また、Gly と $(\text{Gly})_2\text{Cu}$ については(2)式にしたがって k_2 を求めた。こうして得られた各速度パラメーターを Table 1 にまとめた。Figure 3 から 6 中の実線はこれらの速度パラメーターを(1)および(2)式に代入して描かれたものであり、実測値との相関係数は 99% 以上であった。

それぞれの CD 触媒による PNPB および MNPB の加水分解反応について中間体の検出を行った結果、それぞれ 240 および 245 nm での吸光度に迅速な増加と緩やかな減少が観察された。CD による MNPB の加水分解ですでに報告されているように、この吸光度の増減は CD の水酸基が基質カルボニル炭素に求核攻撃して生成したベンゾイル中間体の生成と分解を示すものである。PNPB と MNPB について計算されたそれらの中間体の分解速度 k_{PNPB} と k_{MNPB} は次のようになり、CD についての k_{MNPB} は文献値 ($4.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)⁶ と概ね一致している。

$$k_{\text{PNPB}}: 1.7 \times 10^{-4} \{(\text{CD-gly})_2\text{Cu}\}, 2.7 \times 10^{-4} \{\text{CD-gly}\}, 2.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \{\text{CD}\}$$

$$k_{\text{MNPB}}: 1.8 \times 10^{-4} \{(\text{CD-gly})_2\text{Cu}\}, 3.6 \times 10^{-4} \{\text{CD-gly}\}, 5.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \{\text{CD}\}$$

Table 1 Kinetic parameters for the hydrolysis(deacylation) of nitrophenyl esters ^{a)}

Catalyst	$10^2 k_{un}/$ s^{-1}	$10^2 k_{cat}/$ s^{-1}	$10^3 K_d/$ $mol\ l^{-1}$
PNPA			
CD	0.514	7.35	7.13
CD-gly		25.0	58.4
(CD-gly) ₂ Cu		7.50	4.14
Gly	$k_2 = 1.8\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
(Gly) ₂ Cu	$k_2 = 0.2\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
PNPB			
CD	0.181	0.539	3.85
CD-gly		0.544	4.40
(CD-gly) ₂ Cu		5.11	11.1
Gly	$k_2 = 0.14\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
(Gly) ₂ Cu	$k_2 = 0.06\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
MNPA			
CD	0.442	41.7	8.65
CD-gly		51.2	17.0
(CD-gly) ₂ Cu		33.4	5.62
Gly	$k_2 = 0.26\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
(Gly) ₂ Cu	$k_2 = 0.12\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
MNPB			
CD	0.143	3.03	3.12
CD-gly		2.70	3.69
(CD-gly) ₂ Cu		2.20	0.49
Gly	$k_2 = 0.031\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		
(Gly) ₂ Cu	$k_2 = 0.033\ l\ mol^{-1}\ s^{-1}\ ^b)$		

^{a)} At 25 °C, pH 10.6 (carbonate buffer), and ionic strength 0.2(KCl). ^{b)} Second-order rate constant.

Boc アミノ酸フェニルエステルの加水分解

Table 2 には一定触媒濃度で得られた k_{obs} の値を示してある。Asn のエステルを除いてアミノ酸残基による k_{obs} の違いは少ないが、CD 誘導体による加速効果 ($k_{\text{obs}} / k_{\text{un}}$) は数倍から 30 倍にもなっている。また、それぞれの基質について CD 触媒の k_{obs} に大きな差は認められなかった。Phe の D 体と L 体についても顕著な k_{obs} の違いはなく、(CD-gly)₂Cu よりもむしろ未修飾の CD における方が選択性が現れている。

Asn では k_{un} が他のエステルに比べて極端に大きく、CD 誘導体はその反応を阻害していることがわかる。これはおそらく、Asn の側鎖にあるアミド基の分子内反応によると考えられる基質の分解が、脱離するニトロフェニル基の CD 環への包接によって妨げられたためと推察される。

Table 2 Rate of the hydrolysis of amino acid *p*-nitrophenyl esters in the presence of $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ catalyst^{a)}

Amino acid ester	Buffer	$10^2 k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$				
		Gly	(Gly) ₂ Cu ^{b)}	CD	CD-gly	(CD-gly) ₂ Cu ^{b)}
Gly	0.62	—	—	4.67	2.96	4.79
L-Ala	0.29	—	—	2.73	1.72	2.54
L-Phe	0.20	0.49	0.26	6.47	4.93	8.07
D-Phe	0.21	0.47	0.27	5.11	5.28	8.05
L-Asn	28	—	—	23	16	18
L-Gln	1.43	—	—	5.39	3.55	5.05

^{a)} At 25 °C, pH 9.4 (carbonate buffer), and ionic strength 0.2(KCl). ^{b)} $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$.

長鎖カルボン酸 *p*-ニトロフェニルエステルの加水分解

アシル部分のアルキル鎖長の異なるカルボン酸 *p*-ニトロフェニルエステルの加水分解反応で得られた CD、CD-gly および (CD-gly)₂Cu の濃度変化に伴う k_{obs} のプロットを Figure 7 から 9 に示す。CD (Figure 7) と CD-gly (Figure 8) では、どの濃度においても $n = 0$ の短い基質についての k_{obs} が最も大きく、鎖長が長くなるに連れて k_{obs} は減少していくようである。すなわち $n = 4$ で k_{obs} は最小となり、さらに基質が長くなると再び増加する傾向にある。ところが、(CD-gly)₂Cu では、最も長い $n = 8$ の基質についての k_{obs} は $n = 0$ の k_{obs} より大きく、CD や CD-gly とは明らかに異なる反応性を示している。

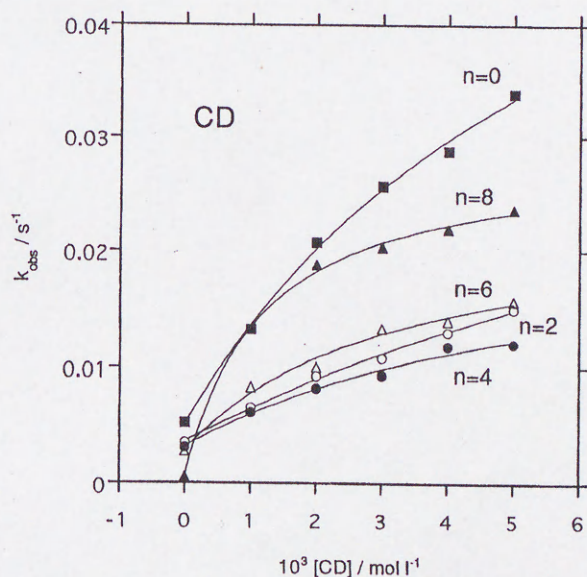


Figure 7. Plots of k_{obs} versus concentration of CD for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl alkanoates.

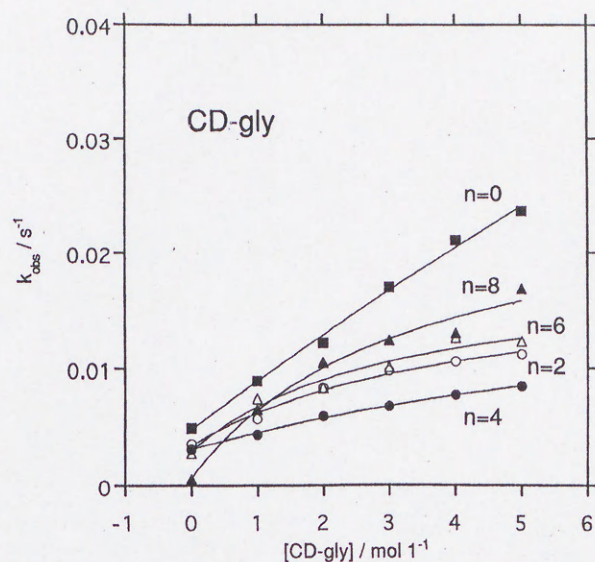


Figure 8. Plots of k_{obs} versus concentration of CD-gly for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl alkanoates.

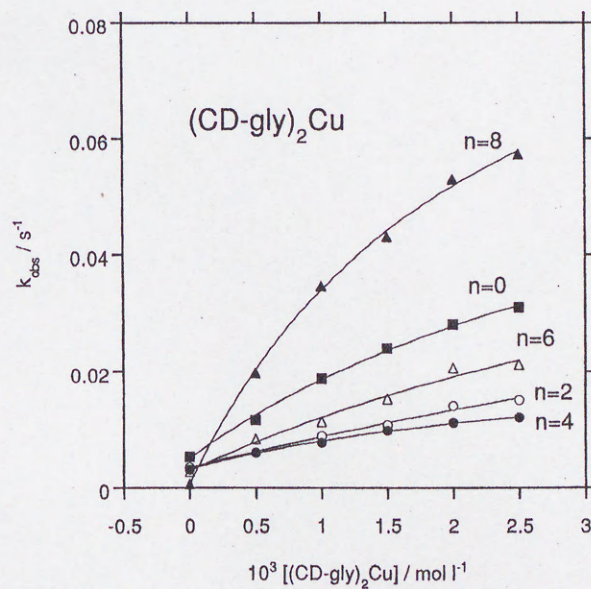


Figure 9. Plots of k_{obs} versus concentration of $(CD-gly)_2Cu$ for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl alkanoates.

これらのプロットも Michaelis-Menten 型の反応速度式で表わされ、(1)式に基づいた非線形最小二乗法によって k_{cat} と K_d を算出した。Figure 7 から 9 の近似曲線はこれらの計算値から描かれたもので、実測値との相関係数は 98.4% 以上である。Table 3 にそれぞれのアルキル鎖長についての k_{cat} と K_d の値をまとめた。

Table 3 Kinetic parameters for the hydrolysis of *p*- nitrophenyl alkanoates ^{a)}

Catalyst	n	$10^2 k_{\text{un}}$ /s ⁻¹	$10^2 k_{\text{cat}}$ /s ⁻¹	$10^3 K_d$ /M
CD	0	0.514	7.35	7.13
	2	0.355	4.62	14.0
	4	0.312	2.31	5.96
	6	0.275	2.38	3.29
	8	0.055	2.87	1.19
GlyCD	0	0.514	25.0	58.4
	2	0.355	1.87	4.51
	4	0.312	2.00	10.7
	6	0.275	1.87	3.18
	8	0.055	2.63	3.47
(GlyCD) ₂ Cu	0	0.514	7.50	4.14
	2	0.355	6.88	11.1
	4	0.312	2.37	3.17
	6	0.275	6.01	4.95
	8	0.055	11.0	2.26

^{a)} At 25 °C, pH 10.6 (carbonate buffer), and ionic strength 0.2 (KCl).

6-3 考 察

6-3-1 グリシン修飾シクロデキストリンと銅イオンとの錯体形成

第1章で説明したように、CD分子は不斉性を持つことから基質ゲスト分子との複合体形成や反応において立体選択性を示すことが知られている。このとき、ゲスト分子そのものが不斉性を持っていなくても、CD-ゲスト複合体はあたかもひとつの不斉分子であるかのように振る舞う。そのため、UV吸収を持つゲスト分子とCDとの複合体は、誘起円偏光二色性スペクトルを示すことになる。⁷

Figure 1 に示すように、UV吸収を持たないCD-glyが Cu^{2+} の添加によって大きな誘起円偏光二色性スペクトルを示したことから、CD-glyは Cu^{2+} と錯体を形成していることが明らかであり、そしてその比率は2:1であることがFigure 2から確認される。pH滴定によって計算された生成定数は大きく、 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ は安定な錯体であることを意味している。しかしながら、1:1の錯体についてはpH 10.6の緩衝液中では白濁を生じ、その溶解度は低かった。そのため、本研究ではこれを $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ との比較のために用いることができなかった。

6-3-2 *m*-および *p*-置換フェニルエステルの加水分解

Figure 3 と 4、および Figure 5 と 6 の比較からわかるように、長い基質の PNPB と MNPB では短い基質の PNPA と MNPA よりも $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ による大きな反応加速が観察された。このような長い基質の加水分解に対する $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の有効性は、期待したように $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ が基質の安息香酸部分とニトロフェニル部分の 2 つの疎水性部位と結合できる 2 個の CD 環を持つためと考えられる。この加速効果は特に MNPB よりも PNPB について著しく大きく、 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ が置換基による位置選択性を持つことが推定された。

Gly 単独および $(\text{Gly})_2\text{Cu}$ はどの基質においても触媒反応性は低い (Figure 3 から 6)。Table 1 に示した Gly の k_2 の値は、 Cu^{2+} の添加によってさらに減少している。このことは Gly の基質カルボニル炭素への求核攻撃が、 Cu^{2+} への配位によって抑えられることを意味しており、 Cu^{2+} による触媒作用は見られなかった。

未修飾の CD は、各種 *m*- および *p*-置換フェニルエステルの加水分解反応で *m* 体選択性を持っていることが明らかにされている。⁸ この選択性は、フェニル基の *m* 位に置換基があることで CD 環に包接された基質カルボニル炭素と CD の二級水酸基が *p* 体の場合に比べて近接するためと説明されている。CD のこの *m* 体選択性は Table 1 の PNPA と MNPA についての速度パラメーターから確認でき、 k_{cat} と K_d の値は文献値⁸ とほぼ一致している。長い基質の PNPB と MNPB についても、CD は同様に *m* 体選択性を有している ($k_{\text{cat}}\{\text{MNPB}\} / k_{\text{cat}}\{\text{PNPB}\} = 5.6$)。このことは、基質のニトロフェニル部分が CD 環内にあり、安息香酸部

分は環の外にあることを示している。6, 9

Figure 3 から 6 の k_{obs} の曲線から、CD-gly の反応性はどの基質についても CD を下回っていることがわかる。つまり、CD 環上の Gly 残基は反応を不利にしていることになる。Table 1 の CD-gly の k_{cat} は、PNPA を除く基質では、CD の値とほとんど同じか少し大きい。そして CD-gly の K_d はすべての基質で CD より大きく、基質との結合は弱くなっていることを示している。この弱められた基質結合は、第 5 章の CD-gly の反応挙動で考察したように、Gly 残基がついたことによる CD 環全体の疎水性の緩和と、Gly 残基が基質反応点のある CD 二級水酸基側ではなく、反対の一級水酸基側にあることから説明できるであろう。ただ、PNPA との反応で見られた CD-gly の大きな k_{cat} と K_d の値は説明できない。ひとつの可能性として、PNPA がその反応点を CD-gly の一級水酸基側にして CD 環に入り、そこで Gly 残基による触媒作用を受けたとも考えられる。

短い基質の PNPA と MNPA についての速度パラメーターには $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ と CD および CD-gly でそれほど大きな差はない (Table 1)。一方、長い基質の PNPB と MNPB については顕著な違いがある。MNPB についての $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の k_{cat} は CD や CD-gly とほとんど同じであるが、驚くべきことに PNPB についての k_{cat} は CD や CD-gly の 9 倍にもなっている。しかもそれは $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の MNPB についての値の 2.3 倍にもなる。しかし、基質結合に関しては $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ は PNPB よりも MNPB に強く結合している ($K_d\{p\} / K_d\{m\} = 23$)。 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ でもベンゾイル CD 中間体が検出されたことから、 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の触媒官能基は、

CD や CD-gly と同じように CD 環上の水酸基だと考えられる。しかし、その水酸基が一級なのか二級なのかは不明である。また、(Gly)₂Cu の反応では Cu²⁺が反応を加速する因子としては作用してないことから、(CD-gly)₂Cu についても Cu²⁺は配位のための中心金属として作用しているだけであると考えられる。

以上のような各 CD 触媒の反応挙動を明確にするため、反応の加速性 ($k_{\text{cat}} / k_{\text{un}}$) と基質選択性 ($k_{\text{cat}} / K_{\text{d}}$)、および遷移状態結合 (K_{TS})¹⁰ を求めて比較した。Figure 10 に示した反応加速性は、アセテートでもベンゾエートでも *m* 体について高い。特に MNPA では最も高く、反応点の近接による効果が現れている。ここで、PNPB では CD や CD-gly に比べて (CD-gly)₂Cu の際立った反応加速性が注目される。触媒の基質に対する反応の有効性を表わす基質選択性 (Figure 11) は、MNPA について最も高い。これは MNPA の k_{cat} が他の基質のものに比べて特に大きいからである。ただし、MNPB については (CD-gly)₂Cu との結合が非常に強いため、MNPA の反応における CD に匹敵する高い基質選択性が現れている。

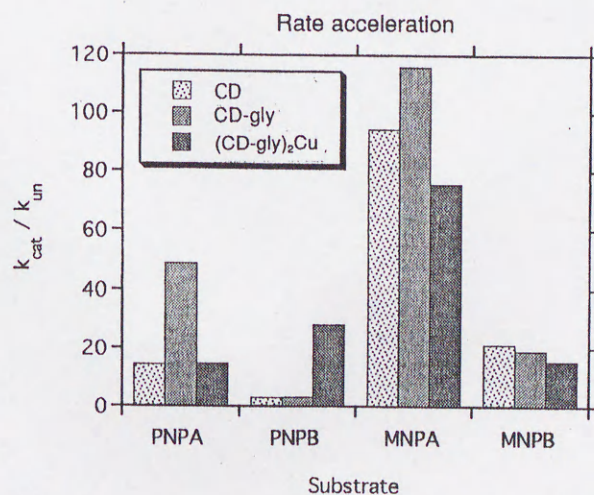


Figure 10. Rate acceleration by catalyst for the hydrolysis of *m*- and *p*-nitrophenyl esters.

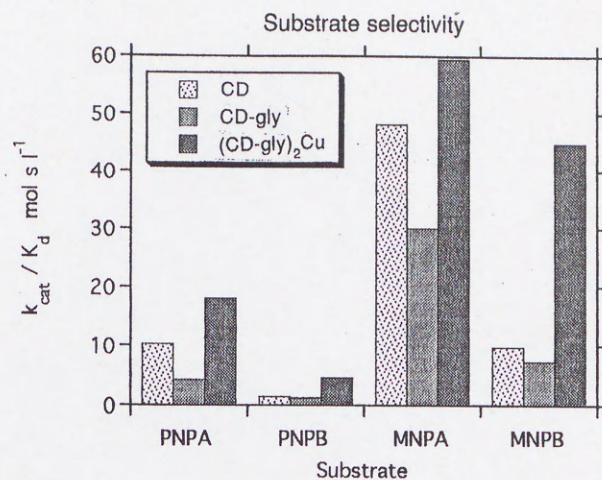


Figure 11. Substrate selectivity of catalyst for the hydrolysis of *m*- and *p*-nitrophenyl esters.

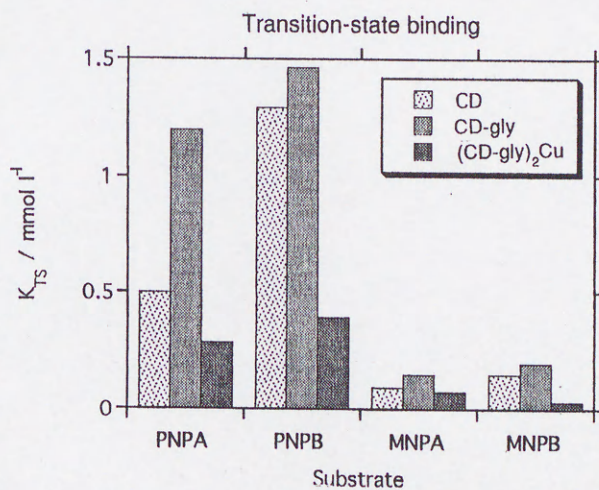
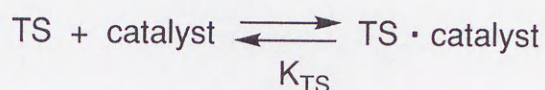


Figure 12. Transition state binding of catalyst for the hydrolysis of *m*- and *p*-nitrophenyl esters.

遷移状態結合は Scheme 4 にあるように生成物を与える遷移状態と、触媒との結合を表わし、(3)式のように K_{TS} は生成物を与える遷移状態と触媒との複合体の解離定数で示される。この K_{TS} の値が小さいほど遷移状態は触媒によって安定化され、その値は触媒の真の有効性を示す尺度にもなり、また一連の反応における K_{TS} の変化を調べることは反応機構の推定にも役立つことが知られている。Figure 12 の K_{TS} は、それぞれの基質と触媒の組み合わせの中で MNPB の反応における $(CD-gly)_2Cu$ が最も遷移状態に結合した触媒、つまり最も優秀な触媒であることを示している。

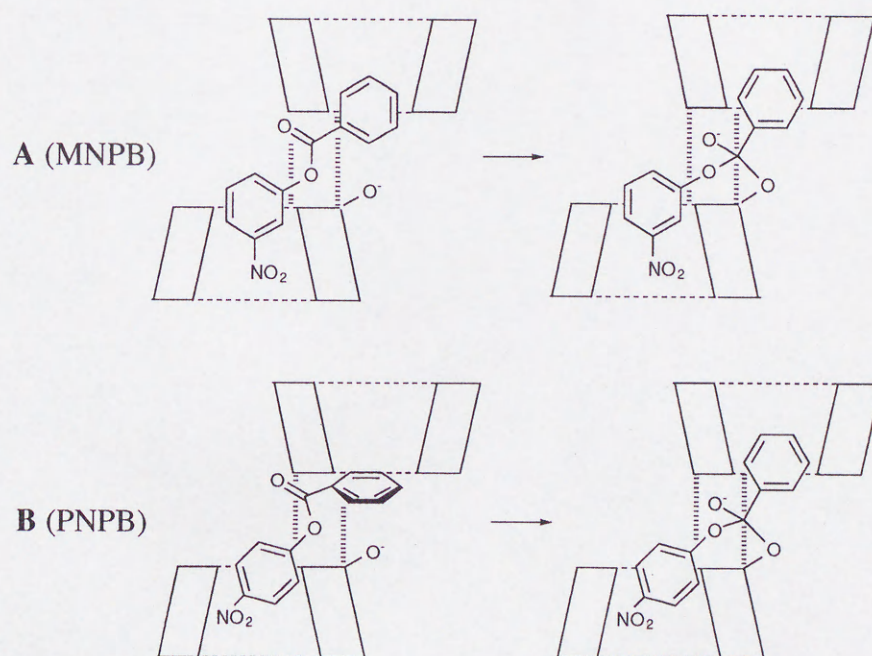


Scheme 4

$$K_{TS} = \frac{[TS][catalyst]}{[TS \cdot catalyst]} = \frac{k_{un}K_d}{k_{cat}} \quad (3)$$

次に、このような $(CD-gly)_2Cu$ による MNPB についての遷移状態の安定化と、PNPB についての高い反応加速性の原因を考察した。CPK 分子モデルを使って $(CD-gly)_2Cu$ を組み立てると、その 2 個の CD 環の中心軸は少しずれていることがわかる。そのゆがんだ構造のため、共有結合した屈曲配列型の CD 2 量体 $2e$ で観察されているように、 $(CD-gly)_2Cu$ は直線的な基質 (PNPB) よりも曲がった基質 (MNPB) と強く結合するに違いない。続いて、CD 内に取り込まれた基質に対して CD 水酸基が攻撃し、四面体付加中間体ができるはずである。そこで、CD-S 複合体を生成する初めの基質結合段階と、その後の生成物を与える遷移状

態に対する $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の結合構造を Scheme 5 のように考えた。この後者の構造では、ベンゾイル CD 中間体は $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の2つの CD 環のうち、ニトロフェニル基を包接している方の CD 一級水酸基が基質カルボニル炭素を攻撃してできることを仮定している。Scheme 5A では、MNPB は曲った分子であるために中心軸のずれている $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ に強く結合し、さらに遷移状態でもよく適合することを表わしている。逆に直線的な PNPB では、Scheme 5B のように基質結合段階では $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ とうまく適合せず、結合は弱い。しかしながら、その後の四面体付加中間体に至る遷移状態は2つの CD 環の協同作用によってある程度まで



Scheme 5

安定化されるであろう。PNPB における $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の K_{TS} の値が CD や CD-gly の値よりも小さくなったのは、このような遷移状態構造の安定化によると推察される。

結論として、グリシンを配位子として持つ $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ は、 Cu^{2+} との 2:1 錯体を形成し、2 量体となった。この 2 量体は安息香酸フェニルエステルのような長い基質に対して大きな反応加速性を示し、さらに、 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ のゆがんだ構造によって、その p 体基質との不利な基質結合が遷移状態では 2 つの CD 環による協同作用によって安定化され、反応を加速していることが示唆された。このような遷移状態の安定化は、酵素の大きな反応加速性の要因のひとつであることが確認され、配位結合によって生じた特異な構造を持つ $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ を用いることによって、反応加速性は不十分であるが、より洗練された酵素型反応を行うことができた。

6-3-3 Boc アミノ酸フェニルエステルの加水分解

CD が不斉の場を持つことから、CD やその修飾体を用いた立体選択的な反応が数多く行われている。¹¹ しかしながら、ここで扱ったような加水分解やアシル基移動反応についての例は少ない。¹² 用いたアミノ酸エステルはニトロフェニル基とかさ高い Boc 基を持つことから、前節で $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ による反応加速性が観察された長い基質に相当すると考えた。Table 2 に示した $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の k_{obs} は Asn を除き、 k_{un} に比べて 10 から数 10 倍大きく加速効果が見られた。しかし、その値はどの基質についても CD や CD-gly とほとんど同じ程度であることから、2 量体にしたことによる効果や Cu^{2+} の効果は現れていない。おそらく、基質および遷移状態の構造が $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ に適合していないためであろう。なお、Asn については k_{un} が他の基質より非常に大きかったが、これはフェノキシアニオンの脱離が Asn 側鎖のアミド基による分子内求核攻撃によるためと考えられる。この基質分子内の反応が CD 環へのニトロフェニル基の結合によって妨げられ、CD 誘導体ではその阻害作用が現れたと考えられる。

残念ながら、アミノ酸エステルの加水分解に対する $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ の目立った効果は観察されなかった。それは、基質および遷移状態の構造が $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ に適合していないためと考えられる。

6-3-4 長鎖カルボン酸 *p*-ニトロフェニルエステルの加水分解

(CD-gly)₂Cu の濃度変化に対する k_{obs} のプロット (Figure 9) では、 $n = 8$ についての加速効果が大きく、CD (Figure 7) や CD-gly (Figure 8) のプロットとは大きく異なっている。これは、Table 3 に示したように (CD-gly)₂Cu の $n = 8$ についての k_{cat} の値が他の鎖長のエステルについての値よりも大きいためと考えられる。なお、これらのプロットで $n = 0$ の酢酸エステルについての k_{obs} は、この章の PNPA の加水分解で得られた値である。Table 3 の K_d の値はどの CD 触媒についてもアルキル鎖長が長くなると減少する傾向にあるが、顕著な差はなく、また触媒による依存性も認められない。これらの速度パラメーターから先の項で行ったように反応加速性や基質選択性、遷移状態結合の各定数を求め、各 CD 触媒の反応挙動を検討した。

速度加速性 (Figure 13) は明らかに (CD-gly)₂Cu の $n = 8$ について 200 倍で最も高い。CD や CD-gly では同じ基質で約 50 倍までしか加速していないことから、

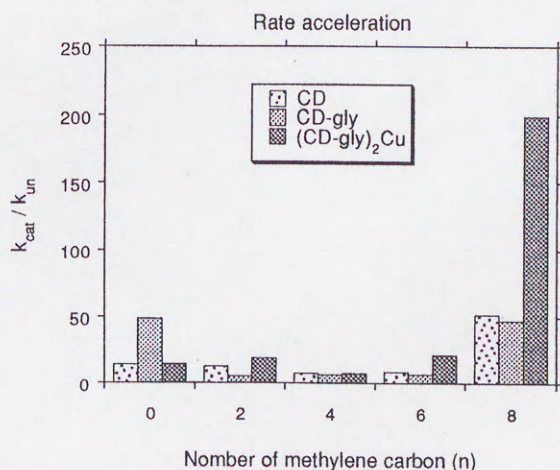


Figure 13. Rate acceleration by catalyst for the hydrolysis *p*-nitrophenyl alkanoates.

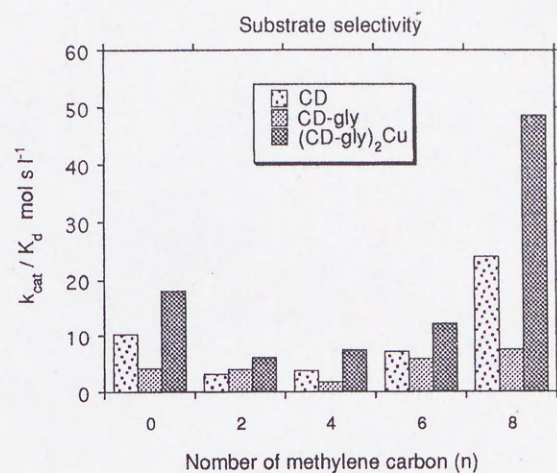


Figure 14. Substrate selectivity of catalyst for the hydrolysis *p*-nitrophenyl alkanoates.

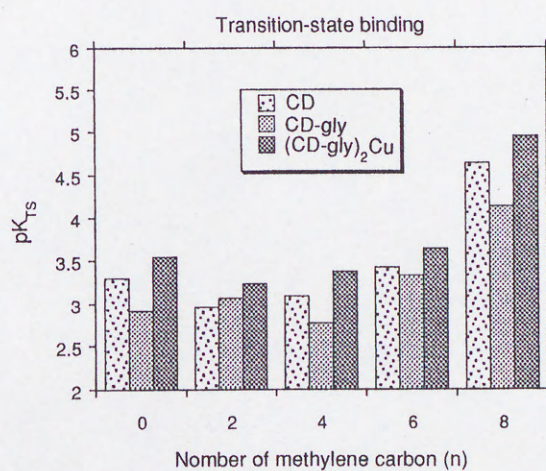
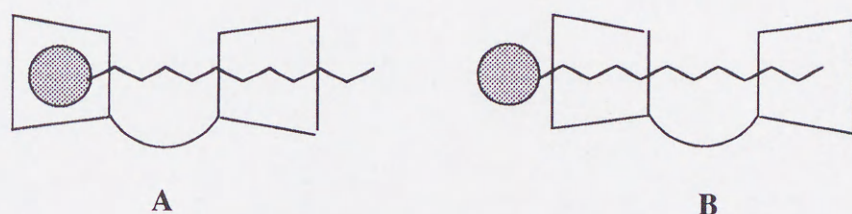


Figure 15. Transition state binding of catalyst for the hydrolysis *p*-nitrophenyl alkanoates.

(CD-gly)₂Cu は明らかに長い基質に対して高い加速性を持っていることがわかる。Figure 14 の基質選択性では、各 CD 触媒や基質における K_d の違いが少ないために、基質鎖長による k_{cat} / K_d の変化は Figure 13 の反応加速性の変化と似たものになっている。その結果、基質選択性でも (CD-gly)₂Cu は $n = 8$ の長い基質との反応に対して高い有効性を示している。遷移状態結合では、基質間の K_{TS} の違いが大きいためその $-\log$ 値である pK_{TS} で比較した。Figure 15 からわかるように (CD-gly)₂Cu の pK_{TS} が最も大きく、CD 環を 2 個持つ (CD-gly)₂Cu は疎水部分の長い $n = 8$ の基質の遷移状態構造に良く適合することを表わしている。このように、基質との単なる結合を表わす K_d では CD 触媒や基質による違いは少なかったが、生成物を与える遷移状態との結合を表わす K_{TS} には特に基質の長さによって大きな違いが生じた。

今回用いたものと同じ基質の未修飾 CD による加水分解は Tee らによって詳しく検討され、基質アルキル鎖長に対する $n = 6$ 付近での pK_{TS} の急な変化から n が 6 以上の基質ではアルキル基部分が、それより短いものではニトロフェニル基部分が CD 環に包接された遷移状態構造をとることが報告されている。¹³ また、同じ反応の誘起円偏光二色性スペクトルの解析¹⁴ からその構造が支持されている。Figure 15 の CD についても $n = 6$ 以上では pK_{TS} が大きく増加しており、上述のようなニトロフェニル基部分からアルキル基部分包接への遷移状態構造の変化が確認される。CD-gly も CD とほとんど同じような pK_{TS} の変化をしていることから、CD-gly での遷移状態構造も CD と同じように基質のアルキ

ル鎖長によって変化すると考えられる。ただし、その結合は CD や $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ に比べて弱いことが pK_{TS} の値からわかる。同様に $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ についても CD と類似した $n=6$ 以上での pK_{TS} の大きな変化が見られる。 $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ は CD 環を 2 個持つため、この pK_{TS} の変化は CD について考えられているような単純なフェニル基部分からアルキル基部分包接への変化ではないかも知れない。CPK 分子モデルの組み立てから、 $n=8$ のアルキルエステルは $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ から炭素原子が 1、2 個分はみ出すくらいの大きさである。このエステルが $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ に包接された構造として Scheme 6 に示したものが考えられる。Scheme 6A はアル



Scheme 6

キル基とフェニル基が $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ のそれぞれの CD 環に入った構造であり、Scheme 6B はアルキル基が 2 個の CD 環にまたがって包接され、フェニル基が CD 環近くの外にある構造をしている。もしも、 n が 0 から 6 程度までのアルキルエステルの $(\text{CD-gly})_2\text{Cu}$ による包接が、未修飾の CD と同じようにフェニル基が CD 環内にありアルキル基部分が CD 環の外にある構造をとっているならば、アルキル基がそれ以上長くなったときの包接が Scheme 6A または 6B のどちらの

構造とつても pK_{TS} は大きく変化すると予想される。しかしながら、 n が 4 から 6 程度の基質でアルキル鎖が CD 環の外にある構造は考えにくく、それらの基質ではフェニル基とアルキル鎖の両方が $(CD-gly)_2Cu$ に包接されていると考えられる。したがって、Figure 15 の $n = 6$ 以上 での急な pK_{TS} の変化は、基質分子全体の包接から Scheme 6B のような長い基質のアルキル基部分だけの包接となった遷移状態構造の変化に対応していると推察される。それでも、Scheme 6A は否定できず、スペクトル的手法や中間体の検出などによって実際の複合体構造を確認しなければならない。

以上のように、長鎖カルボン酸ニトロフェニルエステルの加水分解では $(CD-gly)_2Cu$ が 200 倍もの反応加速性を示した。これは、 $(CD-gly)_2Cu$ の 2 個の CD 環によって遷移状態構造が安定化されたためと考えられ、基質の長さによって反応性に大きな違いが現われてくることを見出した。

6-4 参考文献

- (1) W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969.
- (2) (a) K. Fujita, S. Ejima and T. Imoto, *Chem. Commun.*, 1984, 1277; (b) K. Fujita, S. Ejima and T. Imoto, *Chem. Lett.*, 1985, 11; (c) Y. Okabe, H. Yamamura, K. Obe, K. Ohta, M. Kawai and K. Fujita, *Chem. Commun.*, 1995, 581; (d) R. Breslow, N. Greenspoon, T. Guo and R. Zarzycki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8296; (e) R. Breslow and S. Chung, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 9659; (f) T. Jiang and D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1857; (g) F. Venema, A. E. Rowan and R. J. Nolte et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 257; (h) C. A. Haskard, C. J. Easton, B. L. May and F. Lincoln., *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 14457; (i) R. Breslow and B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 8495; (j) T. Akiike, Y. Nagano, Y. Yamamoto, A. Nakamura, H. Ikeda, A. Ueno and F. Toda, *Chem. Lett.*, 1994, 1089; (k) R. Breslow and B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 5883; (l) R. Breslow and B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 7893; (m) B. Zhang and R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 1676.
- (3) (a) Y. Matsui, T. Yokoi and K. Mochida, *Chem. Lett.*, 1976, 1037; (b) J.-H. Schneider and F. Xiano, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1992, 387.
- (4) K. Mochida, Y. Ozoe, M. Kajiwara and Y. Matsui, *Bull. Fac. Agr. Shimane Univ.*, 1980, **14**, 164.
- (5) K. A. Connors, *Binding Constants*, p.241, Wiley-Interscience, New York, 1987.
- (6) R. L. VanEtten, G. A. Clowes, J. F. Sebastian and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3253.
- (7) M. Otagiri, K. Ikeda, K. Uekama, O. Ito and M. Hatano, *Chem. Lett.*, 1974, 679; K. Harata and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1975, **48**, 375; K. Harata, *Bioorg. Chem.*, 1981, **10**, 255; K. Yamanari, M. Naakamichi and Y. Shimura, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 248.

- (8) R. L. VanEtten, G. A. Clowes, J. F. Sebastian and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3242.
- (9) Y. Matsui, T. Nishioka and T. Fujita, *Topics Curr. Chem.*, 1985, **128**, 61; O. S. Tee, C. Mazza and X.-X. Du, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 3603.
- (10) J. L. Kurz, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 987; O. S. Tee, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1994, **29**, 1.
- (11) K. Takahashi, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 2013.
- (12) F. Cramer and W. Dietsche, *Chem. Ber.*, 1959, **92**, 1739; J. H. Coates, C.J. Easton, S. J. van Eyk, B. L. May, P. Singh and S. F. Lincoln, *Chem. Commun.*, 1991, 759; K. Hamasaki and A. Ueno, *Chem. Lett.*, 1995, 859.
- (13) O.S. Tee, C. Mazza and X. Du, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 3603; O. S. Tee, T. A. Gadosy and J. B. Giorgi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1993, 1705; T. A. Gadosy and O. S. Tee, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1995, 71.
- (14) G. M. Bonora, R. Fornasier, P. Scrimin and U. Tonellato, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1985, 367.

第7章 結 論

本論文では、シクロデキストリンを基質結合部位として、その官能基修飾体を用いることにより加水分解酵素型の反応を検討した。

天然酵素の高い反応加速性と基質選択性を溶液内で再現できることは、酵素の反応機構を理解する上で大いに役立つことである。さらにその作用原理を、生体外で行われている各種の有機反応に適用することによって、高効率、高選択性の反応系を構築することが可能である。それはまた、天然酵素を越える活性を持った人工酵素を創りだせることを意味している。その一つの手立てとして、シクロデキストリンに官能基を結合させたいくつかの修飾シクロデキストリンを合成し、その酵素類似機能の発現を試みた。

第1章では、天然酵素の特徴とそのモデル化の意義を述べ、シクロデキストリンを用いた酵素型反応の構築原理を説明した。

第2章では、酵素の反応機構に基づいたモデルとして、最も基本的な官能基の触媒作用を取り上げた。この章では、多くの酵素の活性中心でプロトンの授受に重要な役割を果たしているヒスチジンのイミダゾール基の一般酸-塩基触媒作用に着目し、その触媒作用は反応点近くの立体障害を受けにくいことを定量的に解析した。さらに、これまで一般酸触媒作用機構として考えられていた一般酸から基質へのプロトン移動が、それらの間に水分子を介するような間接的なものであることを新た

に提起した。

第3章では、アミノ修飾シクロデキストリンとチオグリコール酸修飾シクロデキストリンのイオン性ゲストに対する結合性を調べた。これによって、ホスト-ゲスト間の静電的相互作用がシクロデキストリンの包接能に及ぼす影響は、結合定数で数倍の違いしかないことを明らかにした。

第4章では、置換イミダゾール緩衝液中で未修飾のシクロデキストリンによる酵素型反応を構築した。この反応系は、緩衝剤にもなっているイミダゾールが触媒と阻害剤の両方の作用を持つ珍しい系でもあることが明らかになった。また、シクロデキストリンに取り込まれた基質の分解が、酵素の活性中心で見られるような周囲に存在するイミダゾール基の一般塩基触媒作用によって促進されることも見出した。

第5章では、触媒官能基をシクロデキストリンに共有結合させたヒスタミン修飾シクロデキストリンを用いて高度な酵素型反応を行い、天然酵素と類似のターンオーバー性と中性付近での最大触媒活性を発現させることに成功し、基質結合部位への触媒官能基の近接が重要であることを確認した。

さらにまた、オルトエステルの加水分解におけるグリシン修飾シクロデキストリンの反応遅延効果から、触媒作用を発現させるには、シクロデキストリン内での基質の配向性や空間配置、そして遷移状態における構造などが重要であることもわかった。

第6章では、上記のシクロデキストリン複合体内での基質の配向を制御したり、反応の遷移状態構造との親和性を向上させるために、グリシン修飾シクロデキストリンの銅錯体からなる2量体を設計した。この2量体はシクロデキストリン環を2個持つために、芳香環を2個持つ基質や長鎖アルキル部分を持つ疎水性部分の長い基質の加水分解に高い反応加速性を示した。さらに、この2量体はそのゆがんだ構造によって、安息香酸の *m*- および *p*-ニトロフェニルエステルの加水分解でみられるように、これまでのシクロデキストリンの作用とは異なったメタ/パラ位置選択性を持つことを見出した。これには、2個のシクロデキストリン環の協同作用による遷移状態の安定化が寄与していることを提言した。

以上のように、基質結合部位としてのシクロデキストリンに種々の官能基を修飾し、高機能化させることによって、これまでにない特徴的な酵素型反応を構築することに成功した。

今後、生体から学んだ機能をさらに生かして設計された、より洗練された酵素型反応の構築が望まれる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ご教授くださいました加藤紀元教授に厚く御礼申し上げます。

また、貴重なご助言を戴きました宮野壮太郎教授ならびに西野徳三教授に厚く御礼申し上げます。

そして、常に適切な助言と勇気を与えてくださいました鶴岡工業高等専門学校城戸英郎教授に感謝申し上げます。

さらに、本研究の発端となる貴重な助言と討論をしていただきました東京工業大学戸田不二緒名誉教授ならびに東京農工大学秋山雅安教授に深く感謝申し上げます。

そして、有益な助言と研究試料を提供していただきました広島大学池田幸助教授ならびに東京工業大学池田博助教授に御礼申し上げます。

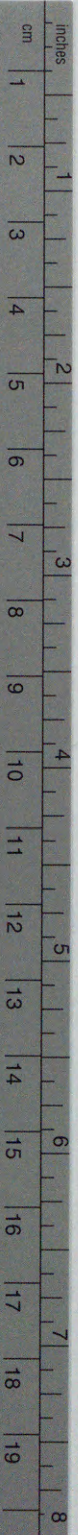
また、研究の遂行に多大のご協力とご援助をいただきました東北大学反応化学研究所加藤研究室の皆様方、鶴岡工業高等専門学校の教職員の皆様方と学生諸君に御礼申し上げます。

最後に、いつも研究への活力を与えてくれた妻美紀子と子供たち、そして優しく見守ってくれた両親に感謝いたします。

1999 年 1 月 20 日

飯 島 政 雄





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

